

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JOÃO RICARDO VICENTE FILHO

**ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DE KOMBUCHA OBTIDA A PARTIR
DE CAFÉ VERDE 100% ARÁBICA**

São Carlos

2023

JOÃO RICARDO VICENTE FILHO

**ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DE KOMBUCHA OBTIDA A PARTIR
DE CAFÉ VERDE 100% ARÁBICA**

Monografia apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos da Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Agnieszka Joanna
Pawlicka Maule

São Carlos
2023

DEDICATÓRIA

Foi pensando nas pessoas que executei este projeto, por isso dedico este trabalho a todos aqueles a quem esta pesquisa possa ajudar de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Química de São Carlos e a Universidade de São Paulo que foram o pilar central para que eu alcançasse o desenvolvimento de minhas habilidades intelectuais e práticas na área de química.

Agradeço muito à Prof^a. Dr^a. Agnieszka Joanna Pawlicka Maule pela orientação e por todo suporte proporcionado para que a conclusão deste trabalho fosse possível. Agradeço à Prof^a. Dr^a. Eny Maria Viera e à aluna de Doutorado Gabriela Reani que me auxiliaram e me dispuseram o uso de seu laboratório. Agradeço ao aluno de doutorado Micael Albuquerque do grupo de bioanalítica e aos técnicos do laboratório de ensino pelo suporte, em especial a técnica Renata Santos.

Aos meus colegas de curso, com quem convivi durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer como pessoa.

RESUMO

A kombucha, originada na Ásia Oriental a mais de 2 mil anos atrás, é uma bebida fermentada de caráter funcional, com propriedades terapêuticas e probióticas. Ela é obtida usando o substrato convencional a *camelia sinensis* (popularmente conhecida como chá verde) e o açúcar. Porém, a literatura tem mostrado evidências de que os microrganismos presentes na cultura do chá e responsáveis pela sua fermentação se adaptam muito bem na presença de outros substratos. A infusão do café em sua versão torrada, é a segunda bebida mais consumida no mundo em decorrência de seu gosto amargo característico e seu forte efeito estimulante. Contudo, sua versão feita a partir de café verde tende a ser uma versão mais saudável da bebida, justamente por não passar pelo processo de torrefação, que por sua vez pode gerar produtos potencialmente maléficos a saúde humana. A proposta do presente trabalho foi analisar e caracterizar cineticamente a kombucha feita a partir de café verde 100% arábica, já que não se existe uma abundância tão grande de trabalhos literários associados a essa versão da bebida e pelo fato do Brasil ser o maior produtor de café no cenário mundial, condição que contribui ainda mais para viabilidade econômica dessa versão da bebida. Dessa forma, realizou-se a caracterização cinética e composicional da bebida em diferentes concentrações de sacarose (açúcar demerara) durante 14 dias para o processo de 1ª fermentação com dados sendo coletados diariamente, e para 2ª fermentação com dados coletados no dia 0 e no 7º dia. Todas as matrizes fermentativas foram alocadas em estufa com temperatura fixada à 25 °C. Para caracterização cinética da bebida foram monitorados os parâmetros de sólidos solúveis totais (SST), pH, acidez total e cor. Para caracterização composicional foram determinados teor alcoólico, teor de compostos fenólicos e a concentração dos ácidos orgânicos presentes nas matrizes fermentativas, sendo esses o ácido acético, o ácido lático e o ácido D-glucônico. Acerca das análises cinéticas do processo fermentativo as diferentes concentrações de açúcar para cada matriz de fermentação resultaram em correlações fortes em relação a análise dos parâmetros físico-químicos da bebida. Já em termos composicionais a bebida apresentou um comportamento diretamente proporcional do teor alcoólico em relação a concentração de sacarose inicial, comportamento que não se repetiu de maneira significativa para os compostos fenólicos e ácidos orgânicos durante o proposto período em que se realizou o estudo.

Palavras-chave: kombucha, café verde, teor alcoólico, cinética, cromatografia

ABSTRACT

Kombucha, originated in East Asia more than two thousand years ago, is a fermented drink with a functional character and therapeutic and probiotic properties. It is obtained by using a conventional substrate *camellia sinensis* (popularly known as green tea) and sugar. However, the literature has shown evidence that microorganisms present in green tea culture adapt very well to the presence of other substrates too. The infusion of coffee in its roasted version is the second most consumed drink in the world due to its characteristic bitter taste and strong stimulating effect. However, its version made from green coffee tends to be a healthier version of the drink, precisely because it doesn't go through the roasting process, which in turn can generate products that are potentially harmful to human health. The purpose of this study was to kinetically analyze and characterize kombucha made from 100% arabica green coffee, since there is not such an abundance of literary works associated with this version of the drink and because Brazil is the largest producer of coffee in the world, a condition that further contributes to the economic viability of this version of the drink. Therefore, the kinetic and compositional characterization of the drink was carried out in different concentrations of sucrose (demerara sugar) during 14 days for the 1st fermentation process with the data being daily, and for the 2nd fermentation with the data collected on day 0 and on the 7th day. All fermentative matrices were placed in an oven with a temperature set at 25 °C. For compositional characterization there were determined the contents of alcohol and phenolic compounds and the concentration of the organic acids such as acetic, lactic and the gluconic acid, present in the fermentative matrices, these being acetic acid, lactic acid and D-gluconic acid. Regarding the kinetic analysis of the fermentation process, the different sugar concentrations for each fermentation matrix resulted in strong correlations in relation to the analysis of the physical-chemical parameters of the drink. In compositional terms, the drink showed a behavior directly proportional to the alcohol content in relation to the initial sucrose concentration, a behavior that was not repeated in a significant way for the phenolic compounds and organic acids during the proposed period in which the study was carried out.

Keywords: kombucha, green coffee, alcohol content, kinetics, chromatography

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – RESUMO DO METABOLISMO ENVOLVIDO NO PROCESSO FERMENTATIVO DA KOMBUCHA	16
FIGURA 2 - CAFÉ VERDE 100% ARÁBICA MOÍDO E PENEIRADO	17
FIGURA 4 - IMAGENS DOS RECIPIENTES COM KOMBUCHA DURANTE A 1ª FERMENTAÇÃO E A 2ª FERMENTAÇÃO ONDE EM (A) MOSTRAM-SE AS MATRIZES REFERENTES A PRIMEIRA FERMENTAÇÃO LOCALIZADO A ESQUERDA DA IMAGEM A MATRIZ COM CONCENTRAÇÃO DE 100 G L ⁻¹ DE SACAROSE E A DIREITA A MATRIZ COM CONCENTRAÇÃO DE 200 G L ⁻¹ DE SACAROSE.	20
FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO PARA ETAPA DE DESTILAÇÃO.....	23
FIGURA 6 – VISUALIZAÇÃO DA MUDANÇA DE COLORAÇÃO NO PONTO DE EQUIVALÊNCIA DA RETROTILULAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE TEOR ALCOOLICO DA KOMBUCHA.	24
FIGURA 7 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DOS ÁCIDOS PESQUISADOS POR CLAE, ÁCIDO D-GLUCÓNICO COM TEMPO DE RETENÇÃO EM 2,75 MIN, ÁCIDO LÁTICO EM 4,57 MIN E ÁCIDO ACÉTICO EM 4,89 MIN.....	25
FIGURA 8 – GRÁFICO DOS VALORES MÉDIOS DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°BRIX) DURANTE A 1ª FERMENTAÇÃO COM ± DP (DESVIO PADRÃO) DE TRIPLICATAS. LOCALIZADO A ESQUERDA DO GRÁFICO A ESCALA EM PRETO REFERENTE A MATRIZ COM 200 G L ⁻¹ DE SACAROSE, E A DIREITA A ESCALA EM AZUL REFERENTE A MATRIZ DE 100G L ⁻¹ DE SACAROSE. EM (B) ESTÁ DISPOSTA A IMAGEM DOS RECIPIENTES QUE ARMAZENARAM AS BEBIDAS PARA CONDUÇÃO DA 2ª FERMENTAÇÃO (FASE DE CARBONATAÇÃO), LOCALIZANDO-SE A ESQUERDA DA IMAGEM ESTÁ O LÍQUIDO PROCEDENTE DA MATRIZ COM CONCENTRAÇÃO DE 100 G L ⁻¹ DE SACAROSE E A DIREITA O DE 200 G L ⁻¹ DE SACAROSE JÁ FERMENTADOS POR 7 DIAS EM CONDIÇÕES AERÓBICAS.	26
FIGURA 9 - GRÁFICO DA MÉDIA DOS VALORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°BRIX) ±DP, MEDIDOS DURANTE 15 DIAS DE FERMENTAÇÃO PARA KOMBUCHAS DE CHÁ VERDE (◆), CHÁ PRETO (▲) E CHÁ OOLONG (■).	27

FIGURA 10 – GRÁFICO DE Δ SST QUE MOSTRA A DIFERENÇA DA VARIAÇÃO DE SST ENTRE AS MATRIZES.	28
FIGURA 11 – AJUSTE LINEAR DOS VALORES DE Δ SST200g L ⁻¹ VERSUS Δ SST100g L ⁻¹	29
FIGURA 12 – SISTEMA DE COORDENADAS DO ESPAÇO DE COR CIE L*A*B*.	31
FIGURA 13 - GRÁFICO DOS VALORES MÉDIOS DO PARÂMETRO DE LUMINOSIDADE L* DAS MATRIZES DURANTE A 1ª FERMENTAÇÃO COM ± DP (DESVIO PADRÃO) DE TRIPLICATAS, E Δ L*.	31
FIGURA 14 - GRÁFICOS DOS VALORES MÉDIOS DO PARÂMETRO DE CROMATICIDADE A* DAS MATRIZES DURANTE A 1ª FERMENTAÇÃO COM ± DP DE TRIPLICATAS, E Δ A*.	32
FIGURA 15 - GRÁFICOS DOS VALORES MÉDIOS DO PARÂMETRO DE CROMATICIDADE B* DAS MATRIZES DURANTE A 1ª FERMENTAÇÃO COM ± DP DE TRIPLICATAS, E Δ B*.	32
FIGURA 16 – VALORES MÉDIOS DE DIFERENÇA DE COR Δ L*, Δ A* E Δ B* EM FUNÇÃO DO TEMPO ENTRE A MT200 E MT100.	34
FIGURA 17 – GRÁFICO DOS VALORES MÉDIOS DE DIFERENÇA TOTAL DE COR (Δ E*) ENTRE MT200 E MT100 EM FUNÇÃO DO TEMPO.	34
FIGURA 18 – AJUSTE LINEAR DOS VALORES DE Δ L * 200g L ⁻¹ VERSUS Δ L * 100g L ⁻¹	36
FIGURA 19 – AJUSTE LINEAR DOS VALORES DE Δ a * 200g L ⁻¹ VERSUS Δ a * 100g L ⁻¹	36
FIGURA 20 – AJUSTE LINEAR DOS VALORES DE Δ b * 200g L ⁻¹ VERSUS Δ b * 100g L ⁻¹	37
FIGURA 21 - GRÁFICO DOS VALORES MÉDIOS DE PH DAS MATRIZES DURANTE A 1ª FERMENTAÇÃO COM ± DP DE TRIPLICATAS.	39
FIGURA 22 – GRÁFICO DOS VALORES MÉDIOS DE ACIDEZ TOTAL DE MT100 COM ± DP DE TRIPLICATAS E AJUSTE.	40

FIGURA 23 – GRÁFICO DOS VALORES MÉDIOS DE ACIDEZ TOTAL DE MT200 COM ± DP DE TRIPLICATAS E AJUSTE SIGMOIDAL EM FUNÇÃO DO TEMPO.	40
FIGURA 23 – GRÁFICO DA 1ª E 2ª DERIVADA DA FUNÇÃO SIGMOIDAL OBTIDA PELO AJUSTE DOS DADOS DE ACIDEZ TOTAL DA MT100.	43
FIGURA 24 – GRÁFICO DA 1ª E 2ª DERIVADA DA FUNÇÃO SIGMOIDAL OBTIDA PELO AJUSTE DOS DADOS DE ACIDEZ TOTAL DA MT200.	43
FIGURA 25 – VALORES MÉDIOS DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS PARA MT100 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	47
FIGURA 26 – VALORES MÉDIOS DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS PARA MT200 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	47
FIGURA 27 – ESTRUTURAS DA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO, CATEQUINA, ÁCIDO CLOROGÊNICO E ÁCIDO 3,5-DICAFEILOQUÍNICO.	48
FIGURA 28 – VALORES MÉDIOS DE TEOR ALCOÓLICO OBTIDO PARA MT100 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	51
FIGURA 29 – VALORES MÉDIOS DE TEOR ALCOÓLICO OBTIDO PARA MT200 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	51
FIGURA 30 – CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA EXEMPLAR DOS ÁCIDOS ANALISADOS POR CLAE, ÁCIDO D-GLUCÓNICO COM TEMPO DE RETENÇÃO EM 2,75 MIN, ÁCIDO LÁTICO EM 4,57 MIN E ÁCIDO ACÉTICO EM 4,89 MIN.	55
FIGURA 31 – VALORES MÉDIOS DE ÁCIDO ACÉTICO OBTIDOS PARA MT100 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	56
FIGURA 32 – VALORES MÉDIOS DE ÁCIDO ACÉTICO OBTIDOS PARA MT200 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	56
FIGURA 33 – VALORES MÉDIOS DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDOS PARA MT100 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	57
FIGURA 34 – VALORES MÉDIOS DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDOS PARA MT200 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	57
FIGURA 35 – VALORES MÉDIOS DE ÁCIDO D-GLUCÓNICO OBTIDOS PARA MT200 COM ± DP DE TRIPLICATAS.	58

FIGURA 36 – VALORES MÉDIOS DE ÁCIDO D-GLUCÓNICO OBTIDOS PARA MT200 COM \pm DP DE TRIPLICATAS.	58
FIGURA 37 – FLUXOGRAMA DOS VALORES PERCENTUAIS DE CADA ÁCIDO EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SACAROSE PARA MT100.	59
FIGURA 38 – FLUXOGRAMA DOS VALORES PERCENTUAIS DE CADA ÁCIDO EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SACAROSE PARA MT200.	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS GERADOS PELO AJUSTE SIGMOIDE APRESENTADO NA FIGURA 22.	39
TABELA 2 - DADOS GERADOS PELO AJUSTE SIGMOIDE APRESENTADO NA FIGURA 23.	40
TABELA 3 – VALORES DAS MÉDIAS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA 2ª FERMENTAÇÃO PROVENIENTE DA MT100 ± DP DE TRIPLICATAS DA MATRIZ DE CONCENTRAÇÃO DE 100 G L ⁻¹	45
TABELA 4 – VALORES DAS MÉDIAS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA 2ª FERMENTAÇÃO PROVENIENTE DA MT200 ± DP DE TRIPLICATAS.	46
TABELA 5 – VALORES CALCULADOS DO VOLUME DE KOMBUCHA A SER INGERIDO V _{IG} , OBTIDOS DA EQ. (4.4.1).	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. ORIGEM DA KOMBUCHA E PROCESSO FERMENTATIVO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. PREPARO DA MATRIZ DE FERMENTAÇÃO.....	17
3.1.1. <i>INGREDIENTES</i>	17
3.1.2. <i>OBTENÇÃO DAS MATRIZES DE FERMENTAÇÃO</i>	18
3.2. AMOSTRAGEM.....	20
3.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
3.4. ANÁLISE DE pH.....	21
3.5. ANÁLISE DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS.....	21
3.6. ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE COR.....	21
3.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	22
3.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO.....	22
3.8.1. <i>PREPARO DE AMOSTRA</i>	22
3.8.2. <i>TITULAÇÃO REDOX</i>	23
3.9. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ TOTAL	24
3.10. DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA 1ª FERMENTAÇÃO....	26
4.1.1. <i>ANÁLISE DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°Brix)</i>	26
4.1.2. <i>ANÁLISE COLORÍMETRICA NO ESPAÇO DE COR CIE L*a*b*</i>	30
4.1.3. <i>ANÁLISE DE pH E ACIDEZ TOTAL</i>	38
4.2. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA 2ª FERMENTAÇÃO....	45
4.3. ANÁLISE DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	46
4.4. ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO.....	49
4.4. ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	55

<i>4.4.1. ÁCIDO ACÉTICO</i>	60
<i>4.4.2. ÁCIDO LÁTICO</i>	61
<i>4.4.3. ÁCIDO D-GLUCÓNICO</i>	62
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Uma das bebidas que vem se popularizando no Brasil e no mundo em decorrência da maior procura da população por alimentos mais saudáveis, funcionais, e com certos efeitos terapêuticos como propriedades antioxidantes, antidiabéticas, auxiliares ao controle de colesterol e até mesmo anticancerígenas é a kombucha, uma bebida doce fermentada de origem asiática, sendo originalmente preparada com o extrato de chá verde e/ou chá preto (*Camellia Sinensis*). A kombucha é o resultado final da fermentação promovida pela associação simbiótica de bactérias (predominantemente do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter*) e leveduras (predominantemente *Saccharomyces Cerevisiae*) do chá adoçado, resultando em uma camada celulósica na superfície do líquido chamada SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts), que aloca vários microrganismos durante o processo fermentativo e sua formação diminui a carga glicêmica da bebida (COELHO et al., 2020).

O café atualmente é a segunda bebida mais consumida no mundo em decorrência de seu gosto característico e seu efeito estimulante, sendo que essa, similarmente ao chá verde utilizado para produção de kombucha, também possui diversas propriedades benéficas para seus consumidores, como propriedades antioxidantes, antifibróticas e antiinflamatórias (BUENO; CHOULJENKO; SATHIVEL, 2021; CHERYL ROCK, RACHEL BLAINE, CHRISTINE COSTA, 2017).

O Brasil se destaca no cenário mundial por estar em primeiro lugar no ranking de países mais produtores de café, com uma área de aproximadamente 27.000 km quadrados destinada ao plantio do grão, produzindo cerca de 2.500.000 de toneladas ao ano (SZENTHE, 2019). Nesse contexto é possível ver que a kombucha obtida usando como substrato o grão de café abre a possibilidade de diversificação de seu uso. Por isso, desenvolver estudos para caracterização e descrição química do comportamento da mesma durante a sua preparação faz-se necessário e é de grande valia tanto para produtores quanto consumidores que participam desse mercado.

Dentre os diversos substratos/extrativos mais comuns utilizados para produção de kombucha, o café verde não é o mais popular, talvez por conta da maior oferta do grão em sua versão torrada, porém diferentemente do café torrado, o café verde não passa pela reação de Maillard que possivelmente é a principal via para formação de acrilamida em café torrado (ALVES et al., 2010), sendo esse componente considerado provavelmente cancerígeno para

seres humanos segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC, 1994). Partindo dessa perspectiva, fica evidente que a caracterização e descrição da bebida fermentada de café verde como substrato/extrato é certamente mais interessante que a bebida fermentada a partir de café torrado.

O fato de que o mundo pós pandemia reforçou uma tendência em certa parte da população por adquirir uma alimentação mais saudável (ZEGLER, 2021), indica que possivelmente a indústria alimentícia pode se moldar a essa nova perspectiva, colaborando para busca e produção de alimentos mais saudáveis e com mais propriedades funcionais e terapêuticas. Certamente isso aliado a perspectiva do Brasil ser o maior produtor de café do mundo, a kombucha de café verde, sendo uma bebida energética, probiótica e antioxidante, se encaixa relativamente bem nessas características de padrões de consumo no cenário brasileiro (OLIVEIRA, 2022).

1.1. ORIGEM DA KOMBUCHA E PROCESSO FERMENTATIVO

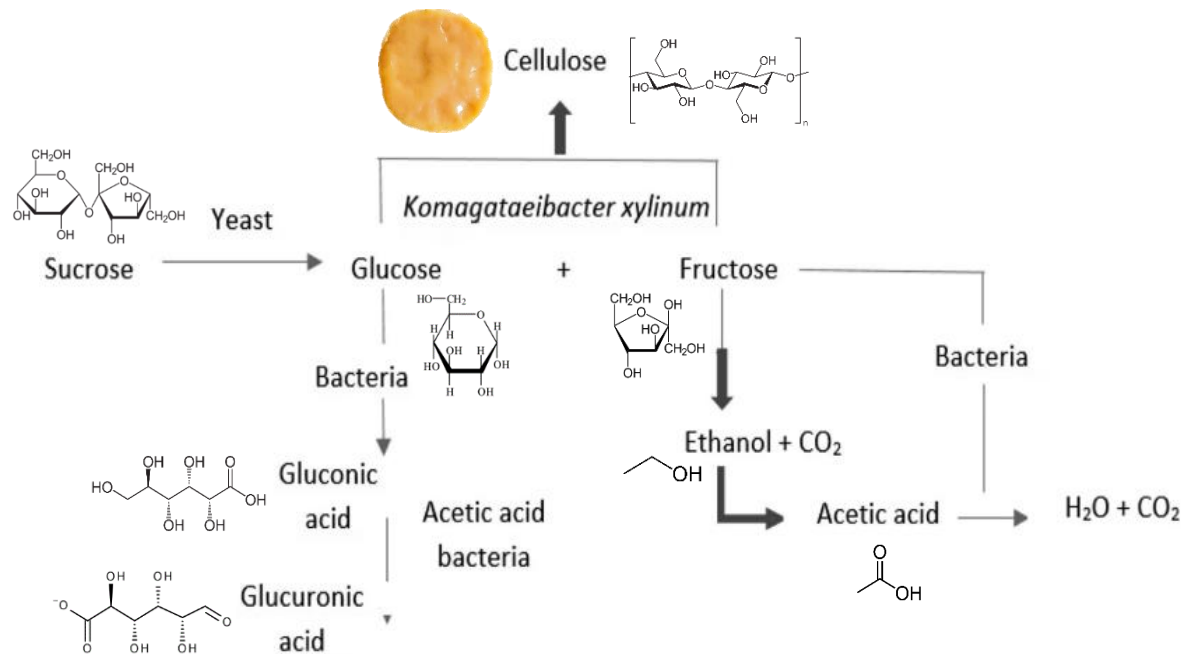
A bebida que é popularmente conhecida como kombucha ou “tea fungus beverage”, apesar de parecer novo para algumas pessoas, ela é uma bebida milenar, onde pesquisadores acreditam que passou a ser consumida pela primeira vez na região da Ásia Oriental 220 anos antes de Cristo por seus benefícios terapêuticos, contudo ela se originou no nordeste da China em uma região chamada de “Manchuria” sendo adotada como uma bebida desintoxicante e estimulante durante a dinastia de Ts’in (época a qual a China passou por um processo de unificação)(JAYABALAN; MALBAŠA; SATHISHKUMAR, 2016).

Por mais que atualmente a bebida seja conhecida e disseminada com o nome de kombucha, ela apenas passou a ser chamada assim 414 anos depois de Cristo, quando supostamente um médico com o nome de Kombu levou a bebida fermentada para o Japão e a usou para curar os problemas digestivos do vigente imperador da época chamado Inkyo. Assim a bebida à base de chá fermentado pelo consórcio de bactérias e leveduras, se popularizou por suas propriedades terapêuticas e passou a ser chamada de “Kombucha”, ou em outras palavras “o chá do médico Kombu” (JORGE, 2016).

Falando acerca do processo fermentativo da kombucha pode-se dizer que assim como a fermentação alcoólica e láctica se dão por sistemas relativamente complexos. Os produtos gerados na fermentação da kombucha são muito variados o que deixa a tarefa de entender os

detalhes de seu sistema bioquímico ainda mais complicada. Na figura 1, pode-se observar de maneira geral e muito simplificada, as vias metabólicas dos organismos presentes nesse sistema.

Figura 1 – Resumo do metabolismo envolvido no processo fermentativo da kombucha



Fonte: (VILLARREAL-SOTO et al., 2018) com modificações feitas pelo autor.

De maneira resumida as leveduras presentes no meio convertem a sacarose em açúcar invertido através da enzima invertase. Esses produtos, por sua vez, passam a ser consumidos tanto pelas próprias leveduras que o convertem para etanol, quanto pelas próprias bactérias que promovem a oxidação dos mesmos gerando os ácidos característicos da bebida e o biofilme de celulose bacteriana na interface ar/solução.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é obter a kombucha a partir de café verde 100% arábica e avaliar de maneira comparativa a influência de diferentes concentrações de sacarose nos parâmetros físico-químicos da bebida, para assim, realizar a caracterização cinética e composicional do processo fermentativo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar cineticamente o processo fermentativo de kombucha obtida a partir de café verde 100% arábica entre duas matrizes de fermentação com concentrações de 100 g L^{-1} e 200 g L^{-1} de sacarose para as 1^{as} e 2^{as} fermentações.
- Analisar comparativamente o comportamento colorimétrico no espaço de cor CIE $L^*a^*b^*$ do processo fermentativo entre as matrizes.
- Analisar comparativamente o comportamento da concentração de íons H^+ neutralizáveis produzidos durante o processo fermentativo através de medidas diretas de acidez total entre as matrizes.
- Analisar comparativamente, de maneira aproximada, o comportamento e a variação de sacarose presente nas matrizes de fermentação a partir da medida de sólidos solúveis totais (SST) durante o processo fermentativo entre as matrizes
- Avaliar e comparar o teor alcoólico, teor de compostos fenólicos totais e a quantidade de ácidos orgânicos obtidos durante o processo fermentativo entre as matrizes

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PREPARO DA MATRIZ DE FERMENTAÇÃO

3.1.1. INGREDIENTES

Café verde 100% arábica moído e peneirado com peneira de aproximadamente 0,5mm de abertura (figura 2), açúcar demerara, água potável (marca Cristal) e SCOBY previamente gerado em uma matriz de café verde 100% arábica, originado da cultura de chá preto.

Figura 2 - Café verde 100% arábica moído e peneirado



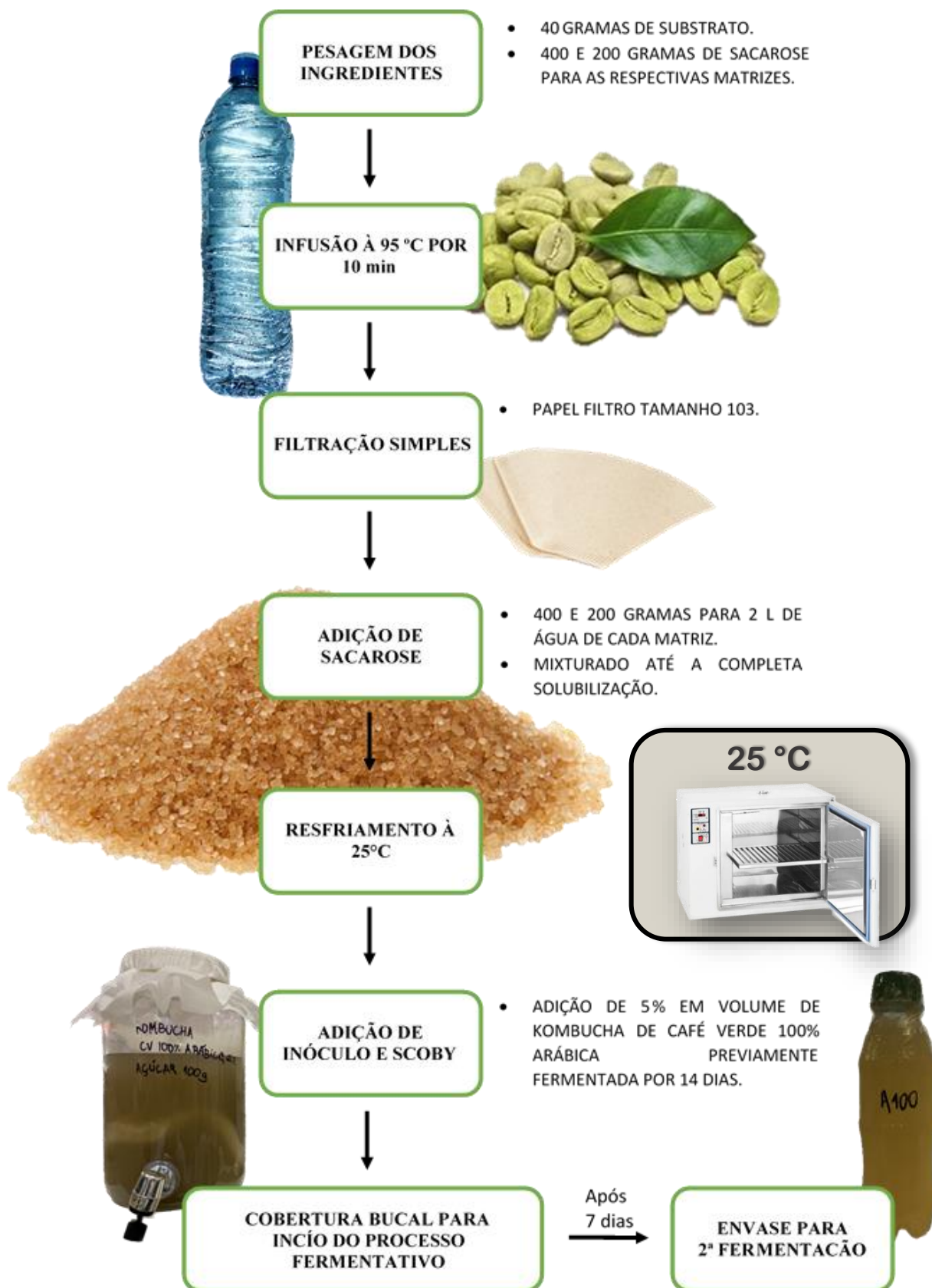
Fonte: autoria própria

3.1.2. OBTENÇÃO DAS MATRIZES DE FERMENTAÇÃO

Para produção da kombucha foram utilizados 2 litros de água potável fervida até atingir o ponto de ebulição ($\sim 95^{\circ}\text{C}$, 856 m acima do nível do mar). A água fervida foi adicionada em um béquer de 2 litros junto a 40 gramas (concentração de 20 g L^{-1} equivalente a 2% w/v) de café verde 100% arábica moído e peneirado. Essa mistura foi mantida abafada e em infusão por cerca de 10 minutos. Posteriormente foram adicionados e completamente dissolvidos 400 gramas de sacarose (açúcar demerara) para matriz com concentração 200 g L^{-1} e 200 gramas de sacarose para a matriz com concentração de 100 g L^{-1} . Após a mistura atingir a temperatura ambiente (25°C) a mesma foi filtrada com papel filtro comercial tamanho 103 (marca 3 Corações) junto a um suporte comum para coar café. Em seguida as soluções foram transferidas e armazenadas em compartimentos cilíndricos de vidro com aproximadamente 15 cm de diâmetro e com uma torneira instalada em suas bases para realização da amostragem (figura 4 (A)), previamente lavados e esterilizados com ácido peracético (Sanitizante PAC200 Pó). Os SCOBYs a serem adicionados cresceram a partir de uma matriz de fermentação preparada anteriormente nas mesmas condições que as descritas neste texto, assim sendo, o SCOBY adicionado possuía o mesmo formato e tamanho da área do recipiente de armazenamento com um diâmetro de 15 cm. Para o inóculo (comumente conhecido como “chá de arranque” ou “starter”) utilizou-se um volume de 100 mL (correspondente a 5% de inóculo) de uma matriz de fermentação de café verde 100% arábica com concentração inicial de 200 g L^{-1} previamente fermentada durante 14 dias (etapas mostradas no fluxograma da figura 3). Dessa forma os recipientes foram cobertos com papel toalha e fixados com um elástico (figura 4 (A)) para evitar possíveis contaminações. O processo de fermentação seguiu com controle de temperatura fixado a 25°C em estufa (marca FANEM – modelo 520-C) durante 14 dias.

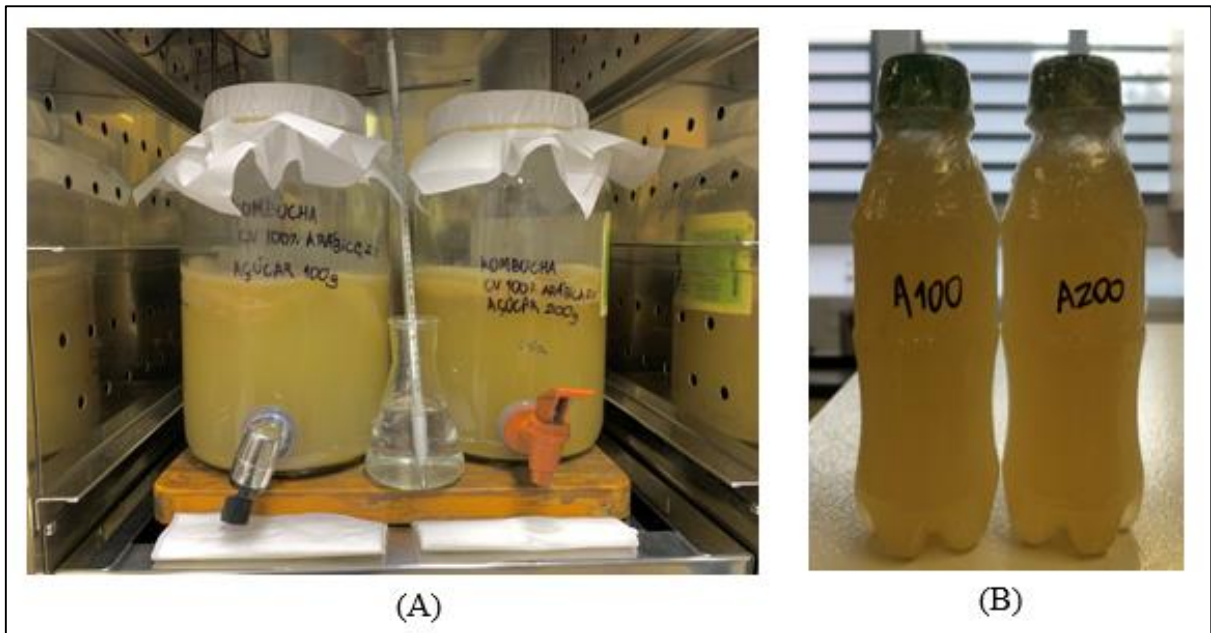
Para as segundas fermentações foram transferidos cerca de 200 ml de cada líquido fermentado do sétimo dia das respectivas matrizes (concentrações de 100 e 200 g L^{-1} de sacarose) para duas garrafas de plástico previamente esterilizadas. As garrafas foram levemente apertadas para que o líquido chegasse até a boca do recipiente, em seguida ambas foram fechadas e vedadas com papel filme para mitigar a troca gasosa do sistema (Figura 4 (B)). O processo de fermentação seguiu com controle de temperatura fixado a 25°C em estufa (marca FANEM – modelo 520-C) durante 7 dias.

Figura 3 - Fluxograma com etapas de preparo



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 4 - Imagens dos recipientes com kombucha durante a 1ª fermentação e a 2ª fermentação onde em (A) mostram-se as matrizes referentes a primeira fermentação localizado a esquerda da imagem a matriz com concentração de 100 g L^{-1} de sacarose e a direita a matriz com concentração de 200 g L^{-1} de sacarose. Em (B) está disposta a imagem dos recipientes que armazenaram as bebidas para condução da 2ª fermentação (fase de carbonatação), localizando-se a esquerda da imagem está o líquido procedente da matriz com concentração de 100 g L^{-1} de sacarose e a direita o de 200 g L^{-1} de sacarose já fermentados por 7 dias em condições aeróbicas.



Fonte: autoria própria

3.2. AMOSTRAGEM

Tanto para as primeiras e segundas fermentações, cujo as matrizes estão dispostas na figura 4, as análises físico-químicas das amostras obtidas foram feitas diretamente das soluções coletadas dos sistemas fermentativos. As amostras da primeira fermentação foram coletadas diariamente e da segunda fermentação no dia 0 e no 7º dia. As amostras sempre eram coletadas nos horários definidos.

3.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As análises físico-químicas das matrizes referentes à 1ª fermentação, foram realizadas diariamente em um intervalo de 0 (momento da inoculação) a 14 dias consecutivos. As quantificações dos conteúdos de teor alcoólico (v/v), teor de compostos fenólicos totais e ácido

orgânicos foram realizadas para o 7º e 14º dia para as matrizes referentes a 1ª fermentação (1ª F), e para o 7º dia nas matrizes referentes a 2ª fermentação (2ª F), com exceção do teor de compostos fenólicos totais que também foi analisado no dia 0.

As análises físico-químicas das matrizes referentes 2ª fermentação foram realizadas apenas no dia 0 e no 7º dia (após o processo de carbonatação).

3.4. ANÁLISE DE pH

Para determinação de acidez na escala de pH se utilizou o método eletrométrico com pHmetro digital e com eletrodo de vidro presentes no laboratório (Marca HANNA, modelo – HI 2550 pH/ORP & EC/TDS/NaCl Meter). Antes de cada determinação o pHmetro foi calibrado com 3 soluções tampão de pH 4, 7 e 10. A determinação do pH foi realizada em triplicata com três amostras de 10 ml cada.

3.5. ANÁLISE DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

O comportamento da quantidade de açúcar presente na kombucha durante as fermentações foi monitorado através do refratômetro digital portátil para medição da sólidos solúveis toatais 0 – 85% (°Brix) (marca HANNA – modelo HI96801). Antes de cada medição refratômetro digital foi calibrado com água destilada e a determinação do conteúdo de SST em °Brix foi realizada em triplicata.

3.6. ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE COR

Os parâmetros do espaço de cor CIE L*a*b* (no caso cor aparente) foram determinados através do espectrofotômetro UV-Vis disponível no laboratório (marca Jasco – modelo V-770 Spectrophotometer). O espectrofotômetro foi parametrizado com uma velocidade de varredura 200 nm/min e um intervalo de coleta de dados de 1 nm no modo de varredura contínua em uma faixa de 200 a 800 nm utilizando como fonte de luz a lâmpada D65. As determinações dos parâmetros de cor foram feitas em triplicatas utilizando como referência água destilada.

3.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

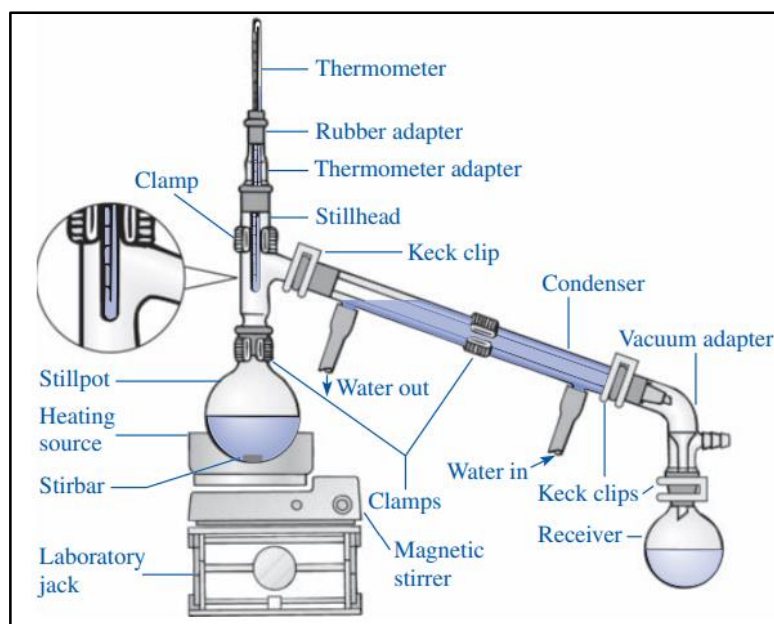
Os teores de fenólicos totais foram determinados seguindo o método colorimétrico de Folin Ciocalteu adaptado de acordo com a amostra (DIAS, 2016). Foram feitas três soluções para a análise: uma solução de Folin Ciocalteu na proporção de 3% (v/v) Folin: água destilada; uma de carbonato de sódio (Na_2CO_3) com concentração de 10% (w/v); e uma solução de 200 mg L^{-1} de ácido gálico (EAG), utilizada para construção da curva padrão. As amostras foram previamente centrifugadas a 4000 rpm, por 10 minutos e filtradas em membrana de 45 μm . Em frascos âmbar, foram adicionados 250 μL da amostra de kombucha e 2750 μL da solução de Folin 3%(v/v) em triplicata, e o mesmo foi realizado para construção da curva de calibração utilizando os padrões. Após 5 minutos de reação sob proteção da luz, foi adicionado 250 μL da solução de carbonato de sódio 10%, agitado e colocado sob abrigo da luz novamente para reagir por 1 hora. Os teores de fenólicos totais foram expressos em mg de equivalentes de EAG (equivalente de ácido gálico) por L de bebida. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (marca Jasco – modelo V-770 Spectrophotometer) em 765 nm à temperatura ambiente.

3.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO

3.8.1. PREPARO DA AMOSTRA

O teor alcoólico foi determinado por cromometria (PRACTICES, 2000). Para o preparo da amostra realizou-se a operação de destilação simples (esquema de destilação mostrado na figura 5). Foram coletas amostras de exatamente 50 mL de cada matriz, alcalinizadas com 1 mL de solução de NaOH com concentração de 2 mol L^{-1} , acopladas ao equipamento de destilação e destiladas para um balão de 250 mL (arrefecido com gelo) 40 mL do produto de topo, posteriormente o produto de topo foi diluído em um balão volumétrico de 100 mL.

Figura 5 - Esquema ilustrativo para etapa de destilação.



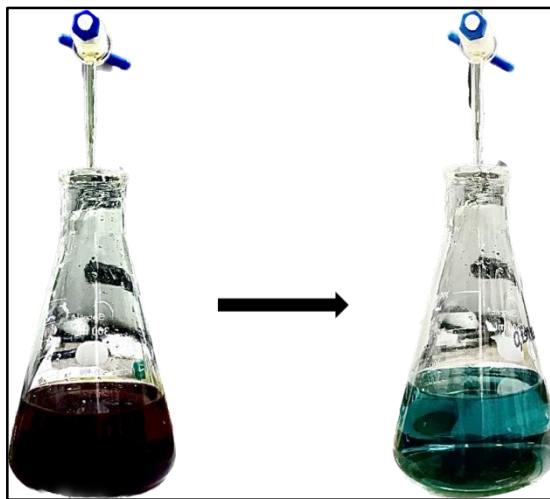
Fonte: (JOHN C. GILBERT, 2011)

3.8.2. TITULAÇÃO REDOX

Para retrotitulação redox foi preparado uma solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) $0,114 \text{ mol L}^{-1}$ feita em água destilada com $K_2Cr_2O_7$ previamente seco em estufa à 120°C por 2 horas, resfriado em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado em balança analítica (Marca: Shimadzu – modelo AUW22D). A solução de ferro (II) (titulante) de concentração $0,342 \pm 0,003 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada com sulfato ferroso amoniacal hexahidratado ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) em água destilada e padronizada com 10 mL da própria solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) $0,114 \text{ mol L}^{-1}$ em meio ácido (12 mL de ácido sulfúrico concentrado e após 30 min 15 mL de ácido fosfórico 85%, procedimento realizado em capela), com a adição da solução de indicador redox difenilamina sulfonato de bário 0,1 % (m/v) (o qual muda de violeta escuro para incolor de sua versão oxidada para sua versão reduzida). O procedimento foi realizado em triplicata. Para quantificação de etanol presente na amostra, em um erlenmeyer de 250 mL foi misturado exatamente 10 mL do produto de topo diluído com 10 mL da solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) $0,114 \text{ mol L}^{-1}$, logo em seguida adicionou-se 12 mL de ácido sulfúrico concentrado, a mistura foi rapidamente vedada com papel PARAFILM e mantida em repouso para total oxidação do etanol presente no meio a ácido acético por 30 minutos. Após a etapa de oxidação do etanol foi adicionado a mistura do titulado

15 mL de ácido fosfórico 85%, 1 mL do indicador redox difenilamina sulfonato de bário 0,1%, e cerca de 100 a 150 mL de água destilada. A mistura foi titulada com a solução de ferro (II) até a visualização do ponto de equivalência, onde se observou a mudança de coloração, saindo de marrom escuro para verde (figura 6). O procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra de cada matriz com a subtração dos valores de controle negativo (branco). Considerando as devidas diluições os cálculos foram expressos em volume alcoólico percentual “% (v/v)” (ou °GL) utilizando a densidade do etanol a 20 °C.

Figura 6 – Visualização da mudança de coloração no ponto de equivalência da retrotitulação para obtenção de teor alcoólico da kombucha.



Fonte: autoria própria

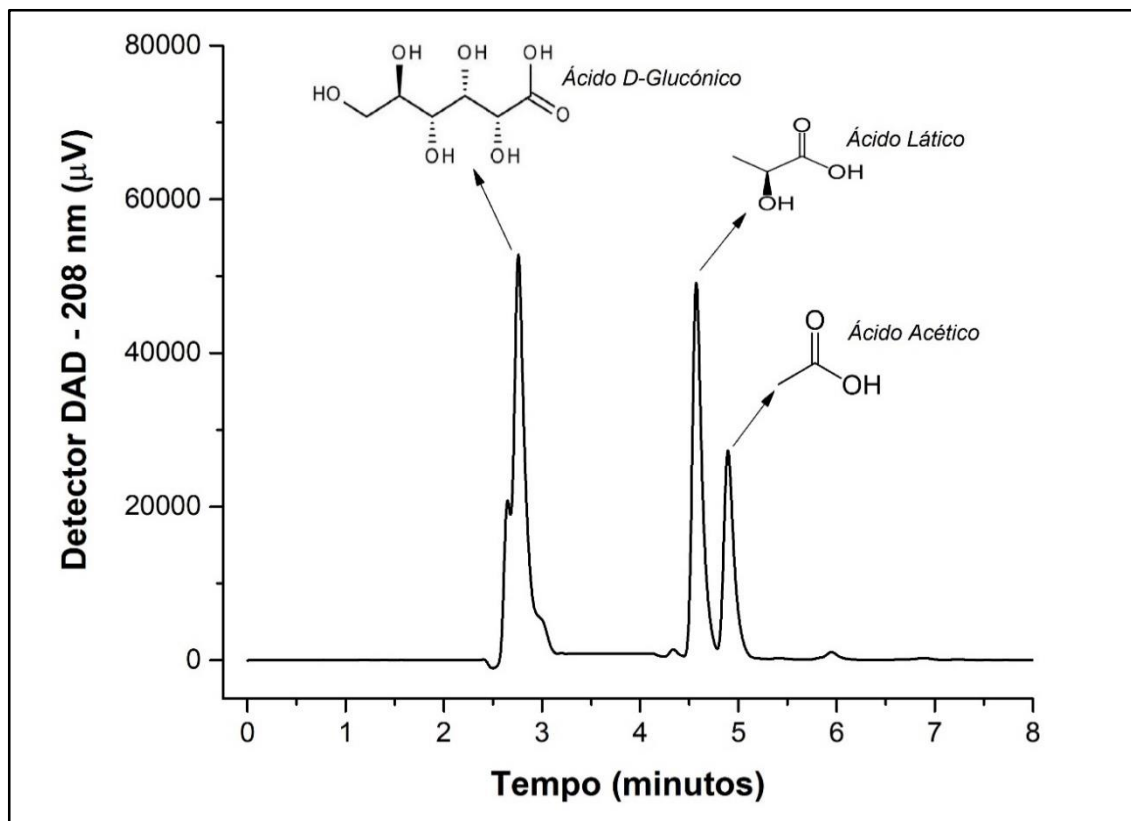
3.9. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ TOTAL

A determinação de acidez total foi realizada por titulação ácido-base com solução de NaOH $0,018 \pm 0,0008 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada com biftalato de potássio previamente seco em estufa à 110° C por 2 horas. O indicador utilizado para determinação do ponto de equivalência foi uma solução de fenolftaleína 1% (m/v) (o qual muda de incolor para coloração rósea no ponto de equivalência) adicionando-se 5 gotas ao titulado previamente a titulação e cerca de 20 a 40 mL de água destilada. Foram titulados 2 mL de amostra em triplicata para determinação da acidez total que foi expressa em mmol L^{-1} de hidrogênios neutralizáveis.

3.10. DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

A determinação da concentração dos ácidos acético, láctico e D-glucônico foi realizada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em cromatógrafo da marca SHIMADZU, modelo PROMINENCE com 2 bombas de fase móvel, modelo LC-20AD, amostrador automático, modelo SIL-20A, forno para coluna, modelo CTO-20A e detector UV de comprimento de onda fixo, modelo SPD-20A. A coluna utilizada para a separação dos ácidos foi uma C18 em fase reversa da marca NTS de dimensões 250 mm x 4,6 mm x 5 μm . A análise dos ácidos foi realizada em fase móvel de tampão NaH_2PO_4 0,2 mol L^{-1} de pH 2,2. Para cada corrida foi utilizado um volume de injeção de 20 μL em sistema isocrático a um fluxo de 1 mL min^{-1} . O detector foi ajustado a um comprimento de onda de 208 nm. As corridas com duração de 10 minutos foram realizadas em triplicatas tanto para a construção das curvas de calibração quanto para a quantificação das amostras. Os ácidos analisados estão dispostos na figura 7 com seus respectivos tempos de retenção.

Figura 7 – Cromatograma dos padrões dos ácidos pesquisados por CLAE, ácido D-glucônico com tempo de retenção em 2,75 min, ácido láctico em 4,57 min e ácido acético em 4,89 min.



Fonte: autoria própria

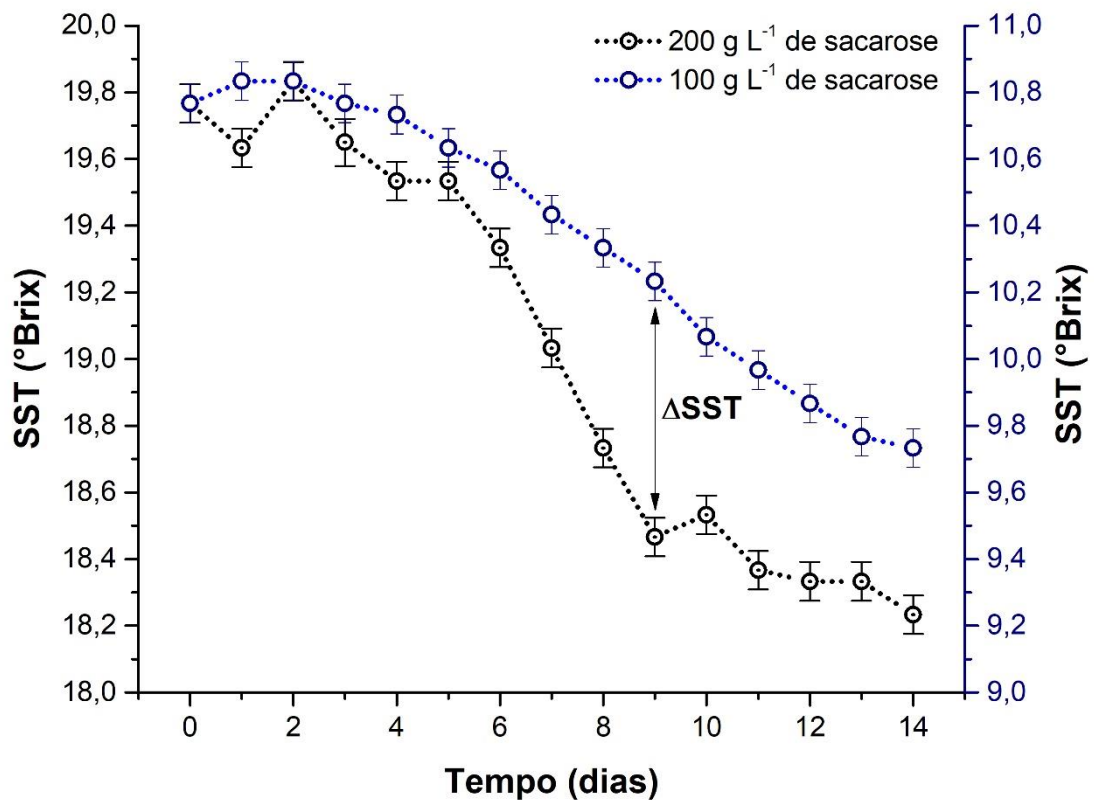
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA 1ª FERMENTAÇÃO

4.1.1. ANÁLISE DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°Brix)

O °Brix é uma unidade de medida que representa uma certa quantidade de sacarose em gramas dissolvida a cada 100 mL de água pura, ou seja, uma solução de 1 °Brix possui a composição de 1 grama de açúcar diluído em 100 mL de água pura, logo, essa unidade de medida se torna relevante pelo fato de que essa mistura possui um índice de refração característico (PILLING, [s.d.]). No caso, os sólidos solúveis totais (SST) monitorados durante a 1ª fermentação em um intervalo de tempo de 14 dias consecutivos, geram um parâmetro aproximado que mostra como ocorreu a variação de sacarose presente nas matrizes de fermentação, o qual pode ser observado comparativamente entre as diferentes concentrações de sacarose na figura 8.

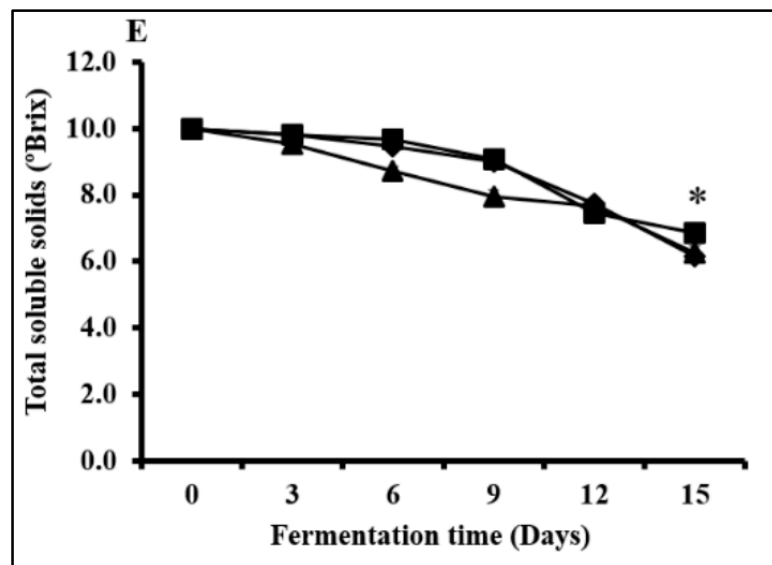
Figura 8 – Gráfico dos valores médios de sólidos solúveis totais (°Brix) durante a 1ª fermentação com \pm DP (desvio padrão) de triplicatas. Localizado a esquerda do gráfico a escala em preto referente a matriz com 200 g L⁻¹ de sacarose, e a direita a escala em azul referente a matriz de 100g L⁻¹ de sacarose.



Fonte: autoria própria

Como pode-se ver na figura 8, o gráfico mostra um pequeno aumento dos sólidos solúveis totais presentes no meio no início do processo fermentativo, que pode estar associado ao processo de glicólise da sacarose, que hidrolisa as moléculas de sacarose em moléculas de frutose e glicose (ASSOCIADA et al., 2007). Essa processo é promovido pelas enzimas liberadas pelas bactérias e leveduras presentes no meio (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Após o terceiro dia, passa a ficar nítido o início de uma queda mais acentuada na quantidade de sólidos solúveis presentes, e segue em uma tendência descendente até o 14º dia de fermentação para ambas concentrações de sacarose, comportamento muito similar ao obtido por Kaewkod et al. que monitorou cineticamente por 15 dias os parâmetros físico-químicos de matrizes fermentativas de kombucha feitas a base de 1% de chá verde (*Camellia Sinensis*), chá preto e chá oolong, partindo de uma concentração inicial de 100 g L⁻¹ de sacarose. Os SSTs dessas matrizes fermentativas obtiveram um padrão de queda relativamente muito similar aos dados dispostos na figura 8, como pode ser observado para fins comparativos na figura 9.

Figura 9 - Gráfico da média dos valores de sólidos solúveis totais (°Brix) ±DP, medidos durante 15 dias de fermentação para kombuchas de chá verde (◆), chá preto (▲) e chá oolong (■).



Fonte: (KAEWKOD; BOVONSOMBUT; TRAGOOLPUA, 2019)

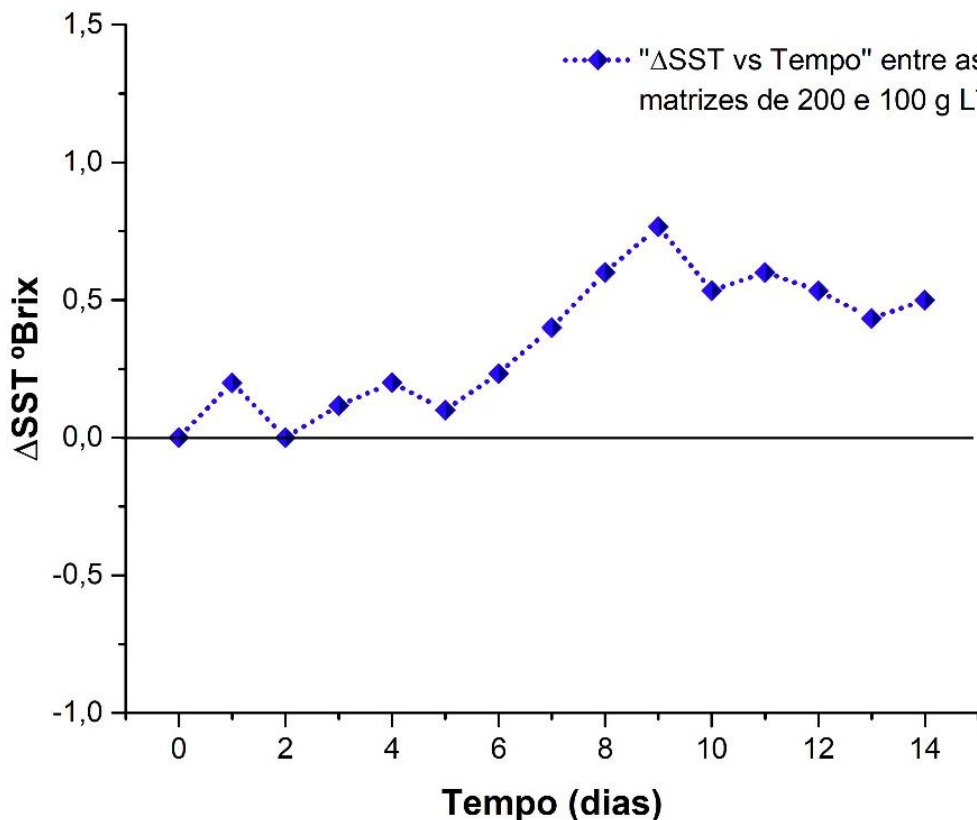
Para verificar de maneira proporcional se a variação de sólidos solúveis totais entre as matrizes de fermentação com concentrações de 100 e 200 g L⁻¹ de sacarose tiverem grandes ou baixas diferenças de comportamento entre si durante o processo fermentativo, foi realizado a conversão dos valores de SST para valores de variação de SST (Δ SST_{concentração}) entre os dias,

foi calculado pela diferença entre dos valores de SST do início do processo fermentativo (tempo 0) e os valores de SST dos dias consecutivos. Por exemplo, para a matriz de 100 g L⁻¹, o valor de $\Delta SST_{100g L^{-1}}$ (que é a variação do valor de SST para matriz com concentração de 100 g L⁻¹) no 4º dia seria o valor de SST no tempo 0 (que é igual a 10,8 °Brix) menos o valor de SST no 4º dia (que é igual a 10,7 °Brix), assim $\Delta SST_{100g L^{-1}}$ para o 4º dia seria igual a 0,1 °Brix, que trata-se do valor de variação em relação ao tempo 0 do processo fermentativo. O mesmo cálculo foi realizado para a matriz com concentração de 200 g L⁻¹.

Dessa forma os valores de variação de SST (ΔSST) entre as matrizes fermentativas (figura 8), que está designado na figura 10 como ΔSST foi calculado pela diferença entre os valores de $\Delta SST_{200g L^{-1}}$ e $\Delta SST_{100g L^{-1}}$ de cada matriz seguindo a equação (4.1.1).

$$\Delta SST = \Delta SST_{200g L^{-1}} - \Delta SST_{100g L^{-1}} \quad \text{Eq. (4.1.1)}$$

Figura 10 – Gráfico de ΔSST que mostra a diferença da variação de SST entre as matrizes.

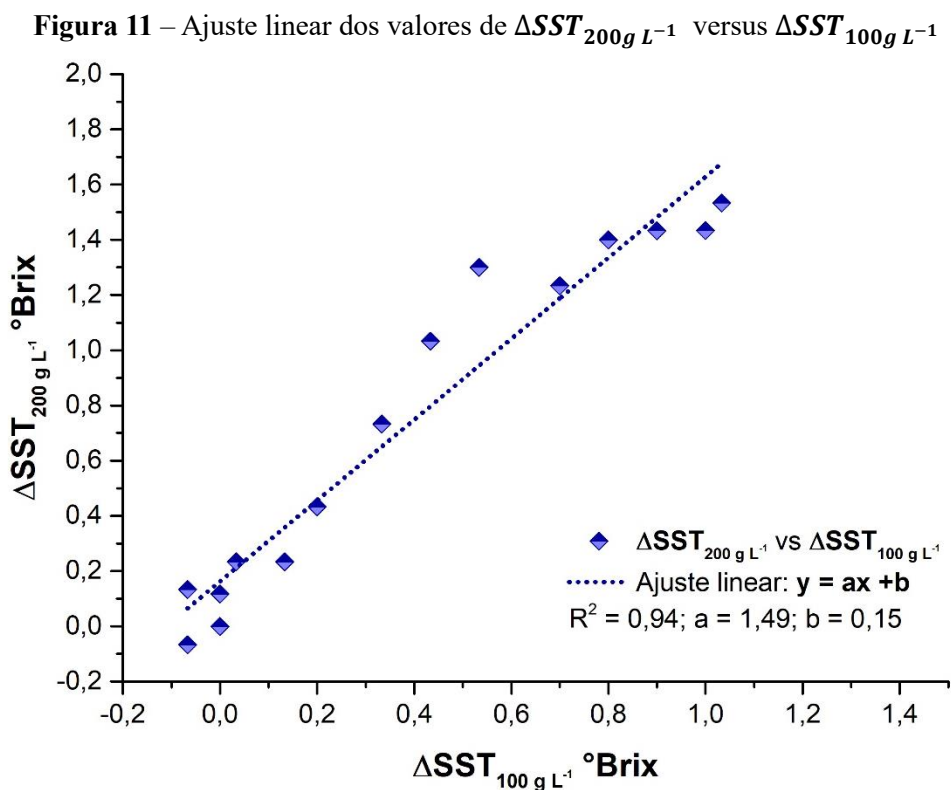


Fonte: autoria própria

Sendo $\Delta SST_{200g L^{-1}}$ valor de variação de SST em relação ao tempo 0 para matriz com

concentração de 200 g L^{-1} e $\Delta\text{SST}_{100\text{g L}^{-1}}$ valor de variação de SST em relação ao tempo 0 para matriz com concentração de 100 g L^{-1} .

Como pode ser observado na figura 10, fica evidente que a matriz de fermentação com concentração de 200 g L^{-1} teve uma queda maior de seu conteúdo de SST que a matriz com concentração de 100 g L^{-1} durante o processo fermentativo, possuindo um valor de ΔSST de $0,4 \text{ }^\circ\text{Brix}$ menor que a matriz com concentração de 100 g L^{-1} no final do processo fermentativo. Isso sugere que maiores concentrações de sacarose presente no meio durante o processo fermentativo da kombucha de café verde 100% arábica propicia também um maior consumo da mesma pelos microrganismos presentes (*Saccharomyces Cerevisiae* e bactérias do gênero acetobacter e lactobacillus)(WATAWANA et al., 2017).



Fonte: autoria própria

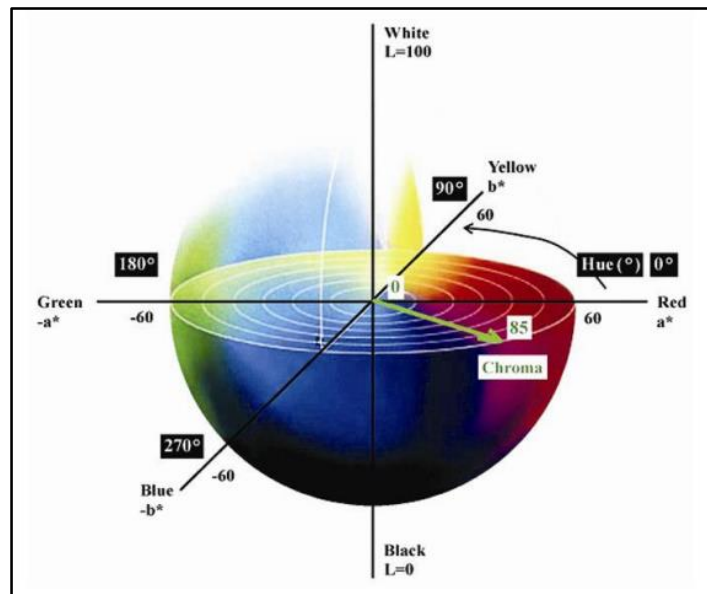
Um ponto importante a se destacar é que a associação do consumo de sacarose pelos microrganismos com a variação no parâmetro de SST só é viável pelo fato que as moléculas de açúcar possuem um peso maior no índice de refração que as moléculas dos produtos formados. Logo a queda que pode ser observada no perfil cinético dos SSTs de ambas as matrizes (figura 8) é diretamente proporcional diminuição no teor de açucares da solução.

A figura 11 mostra o gráfico dos dados calculados de $\Delta SST_{200g L^{-1}}$ contra $\Delta SST_{100g L^{-1}}$, nela é possível analisar e comparar de maneira quantitativa como ocorreu a variação do consumo de sacarose presente no meio entre as matrizes. O ajuste linear mostrado no gráfico gera uma equação com coeficiente angular maior que zero, confirmando que a relação entre as variações de SST de cada matriz é diretamente proporcional, ou seja, se a matriz de 200 g L⁻¹ tem uma variação negativa de seus valores de SST, a matriz de 100 g L⁻¹ também variará negativamente em média, e vice-versa. O coeficiente angular “a” que possui valor de 1,49 passa uma noção de quanto a matriz com concentração de 200 g L⁻¹ variou seu conteúdo de SST em relação a variação do conteúdo de SST da matriz de concentração de 100 g L⁻¹, em outras palavras em uma perspectiva geral, se a matriz de 100 g L⁻¹ variar cerca de 0,1 °Brix a matriz de 200 g L⁻¹ variará em média cerca de 0,149 °Brix, ou seja, quantitativamente a matriz de 200 g L⁻¹ consome no geral 1,5 vezes mais sacarose que a matriz de 100 g L⁻¹ durante processo fermentativo monitorado dentro do intervalo de fermentação de 14 dias. Em síntese, isso mostra que as kombuchas de café verde 100% arábica preparadas com maior teor de sacarose também irão consumir uma maior quantidade de sacarose em uma perspectiva geral de análise do conteúdo de sólidos solúveis totais.

4.1.2. ANÁLISE COLORÍMETRICA NO ESPAÇO DE COR CIE L*a*b*

O parâmetro cor é uma característica simples, objetiva e de baixo custo para ser analisada, estando presente em praticamente em toda a cadeia produtiva de alimentos, tanto na agricultura quanto na agropecuária (FERREIRA; SPRICIGO, 2017). A cor de um objeto está associada aos comprimentos de onda não absorvidos e assim refletidos pelo mesmo. O sistema de cor CIE L*a*b* de uma perspectiva newtoniana, cujo a sigla significa Commission Internationale de l’Eclairage’s funciona como um sistema de coordenadas tridimensional de variáveis independentes (figura 12), sendo L* a componente de luminosidade que está contida em um intervalo de 0 a 100, ou seja, L=0 significa ausência de luz (preto) e indica que todos os comprimentos de onda na faixa do visível são absorvidos, L=100 indica que todos os comprimentos de onda na faixa do visível foram refletidos (branco). As componentes a* e b* representam a posição cromática desse sistema de cores, a* varia de -60 (verde) a +60 (vermelho) e b* de -60 (azul) a +60 (amarelo) (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013).

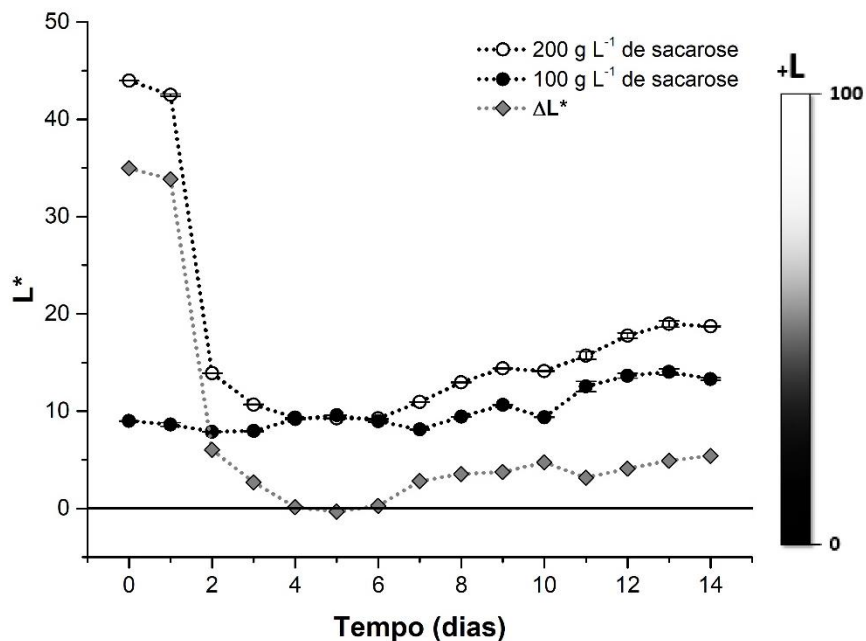
Figura 12 – Sistema de coordenadas do espaço de cor CIE $L^*a^*b^*$.



Fonte: (KULCU, 2018)

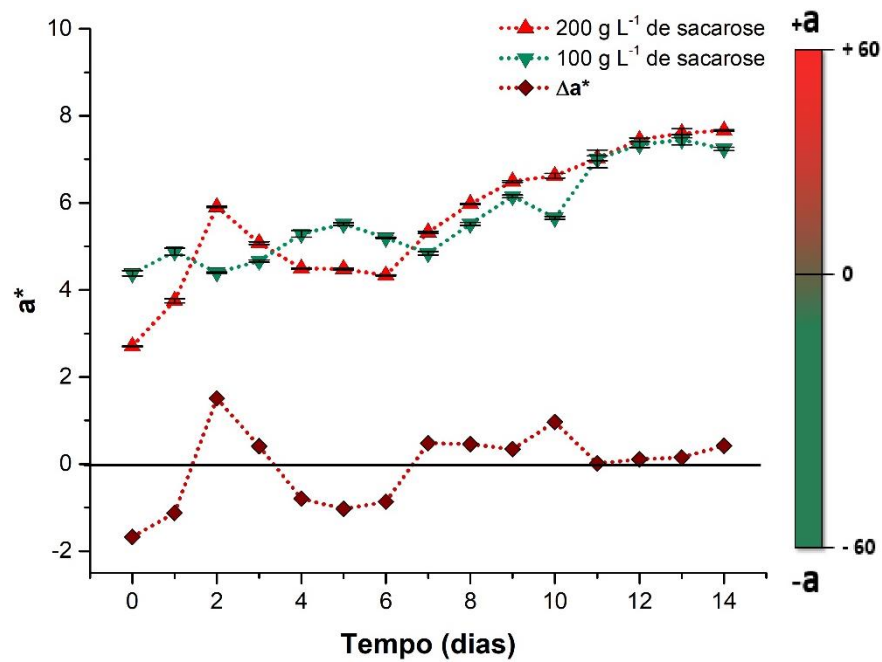
As figuras 13, 14 e 15 apresentam de forma comparativa a variação das coordenadas L^* , a^* e b^* e suas respectivas variações ΔL^* , Δa^* e Δb^* (calculados pela diferença dos valores dos parâmetros de cor da matriz de 200 g L^{-1} pelos da matriz de 100 g L^{-1}) no sistema de cor CIE $L^*a^*b^*$ entre as matrizes de diferentes concentrações de sacarose, 100 g L^{-1} e 200 g L^{-1} .

Figura 13 - Gráfico dos valores médios do parâmetro de luminosidade L^* das matrizes durante a 1ª fermentação com \pm DP (desvio padrão) de triplicatas, e ΔL^* .



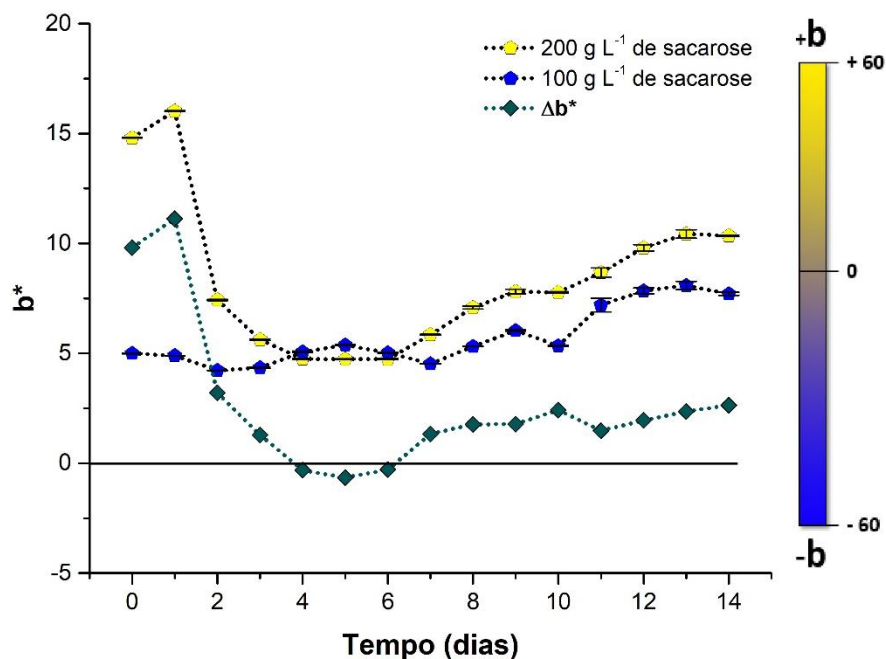
Fonte: autoria própria

Figura 14 - Gráficos dos valores médios do parâmetro de cromaticidade a^* das matrizes durante a 1ª fermentação com \pm DP de triplicatas, e Δa^* .



Fonte: autoria própria

Figura 15 - Gráficos dos valores médios do parâmetro de cromaticidade b^* das matrizes durante a 1ª fermentação com \pm DP de triplicatas, e Δb^* .



Fonte: autoria própria

Analisando os dados dispostos nas figuras 13, 14 e 15 pode-se observar que no início do processo fermentativo a matriz com concentração de 200 g L⁻¹ de sacarose (que a partir deste

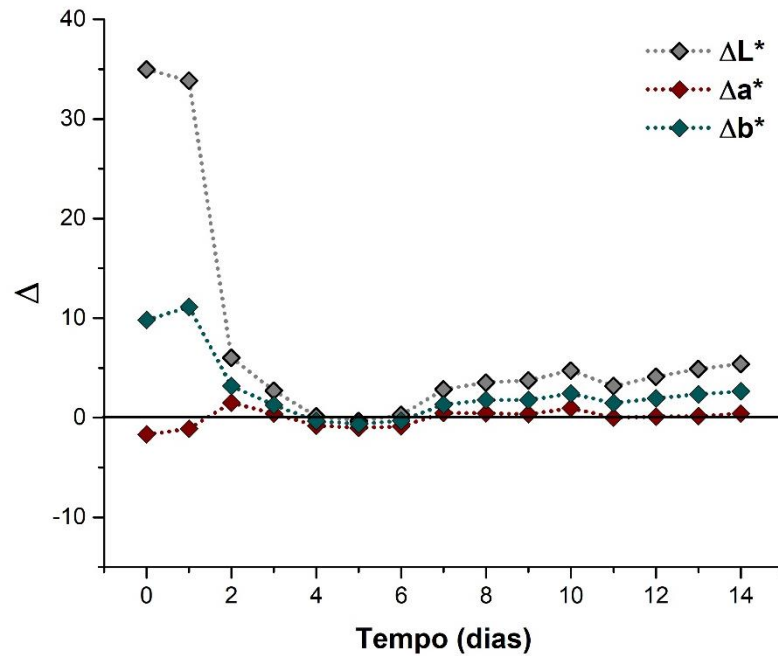
ponto do texto passará a ser chamada de **MT200**) apresentou valores de L^* e b^* muito maiores que na matriz com concentração de 100 g L^{-1} sacarose (que a partir deste ponto do texto passará a ser chamada de **MT100**), e após o 1º dia de fermentação esses valores decaíram abruptamente para um patamar de valores mais próximos da MT100. Esse fenômeno pode possivelmente estar associado ao fato do açúcar demerara apresentar cerca de 3% de sólido insolúveis (S/A., 2023) como melanoidinas (OLIVEIRA, 2014) que são polímeros amarronzados de alto peso molecular formados pela reação de Maillard (reação de açúcares redutores com aminoácidos, em especial com o aminoácido lisina (DALA et al, 2021)) e outros pigmentos adjuntos a sua composição provindos das cana-de-açúcar e dos processos pelos quais ela passa. Logo, com o dobro da concentração desses componentes é plausível que haja uma grande diferença colorimétrica entre as duas matrizes fermentativas em um primeiro momento. Contudo, esses componentes do açúcar demerara que estavam em uma condição coloidal no meio devido a dissolução a quente, com o passar do tempo, podem ter precipitado, e a diferença colorimétrica dos parâmetros de cor L^* e b^* entre as matrizes pode ter diminuído em decorrência desse fenômeno.

Um ponto importante a ser destacado, é que entre o 4º e 6º dia de processo fermentativo, as matrizes colorimetricamente assumiram valores muito similares entre si, principalmente falando dos parâmetros de cromaticidade (a^* e b^*) que até se cruzaram de maneira significativa. Em outras palavras a MT100 passou a refletir mais comprimentos de onda na faixa do vermelho e amarelo que a MT200, e isso também pode ser averiguado e confirmado pela perspectiva dos parâmetros de diferença de cor Δa^* e Δb^* entre as matrizes, cujo Δa^* nesse período passou a ser negativo e Δb^* que também passou a ser negativo. Já o parâmetro L que mede o nível luminosidade, assumiu valores com uma diferença muito baixa, com ΔL^* chegando a valores próximos de zero entre o 4º e 6º dia de fermentação.

A figura 16 dispõe para fins comparativos, os dados de diferença de cor ΔL^* , Δa^* e Δb^* entre MT200 e MT100 que também estão presentes de maneira separada nas figuras 13, 14 e 15 respectivamente em um só gráfico. A partir deles pode-se fazer cálculo do parâmetro de diferença total de cor ΔE^* , que se trata da norma do vetor que liga as coordenadas de cor de cada matriz de fermentação. Logo ΔE^* (diferença total de cor), que está apresentado na figura 17 em função do tempo, pode ser calculado pela equação (4.1.2) (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013).

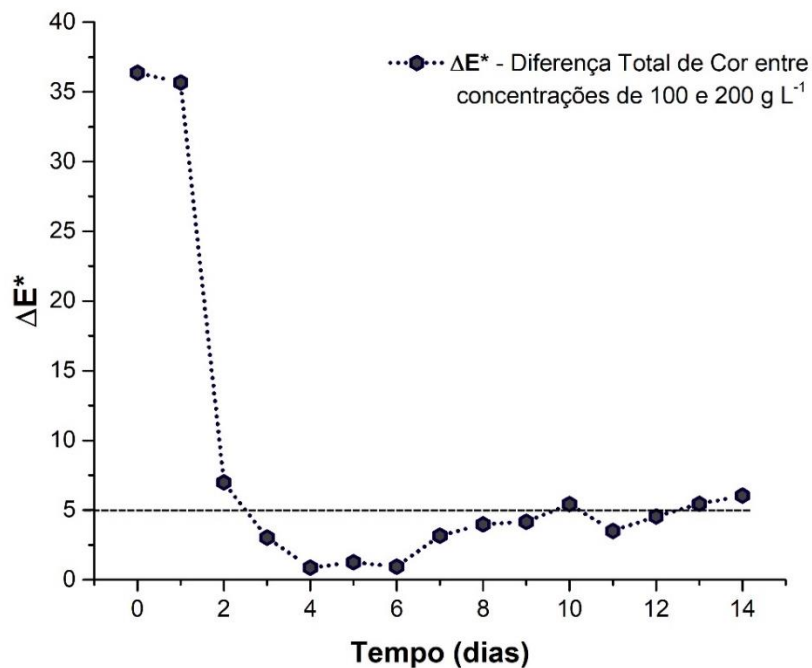
$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad \text{Eq. (4.1.2)}$$

Figura 16 – Valores médios de diferença de cor ΔL^* , Δa^* e Δb^* em função do tempo entre a MT200 e MT100.



Fonte: autoria própria

Figura 17 – Gráfico dos valores médios de diferença total de cor (ΔE^*) entre MT200 e MT100 em função do tempo.



Fonte: autoria própria

Observando a figura 16 e 17 pode-se notar que após 7º dia de fermentação os parâmetros de cor passaram a adquirir um comportamento mais estável em termos de variação colorimétrica entre as matrizes fermentativas, isso fica evidente pelo fato de que as variáveis ΔL^* , Δa^* e Δb^* e ΔE^* (que é produto das mesmas) passaram a assumir um perfil mais constante com ΔL^* ficando próximo do valor 5, Δa^* ficando próximo do valor 0, Δb^* ficando próximo do valor 2, em decorrência desse fato ΔE^* também assumiu o mesmo perfil ficando próximo do valor 5.

Para avaliar e possivelmente confirmar que entre o 7º e 14º dia de fermentação a condição colorimétrica entre as matrizes MT200 e MT100 passaram a variar de maneira similar, calculou--se e se plotou ajustes lineares da variação dos parâmetros de cor de cada matriz em relação ao seu 7º dia de fermentação, para que assim ficasse nítido a visualização desse possível padrão de comportamento entre o 7º e 14º dia de fermentação. Os cálculos de cada variável mostrada nas figuras 18, 19 e 20 estão dispostos a seguir nas equações (4.1.3), (4.1.4), (4.1.5), (4.1.6), (4.1.7), (4.1.8) com valores calculados do 7º ao 14º dia. É interessante ressaltar que os valores dessas variáveis ($\Delta L^*_{200g L^{-1}}$, $\Delta L^*_{100g L^{-1}}$, $\Delta a^*_{200g L^{-1}}$, $\Delta a^*_{100g L^{-1}}$, $\Delta b^*_{200g L^{-1}}$ e $\Delta b^*_{100g L^{-1}}$) são referentes a variação entre os próprios valores de cada matriz e *não* entre as matrizes, sendo “ t ” uma variável discreta referente aos dias de fermentação.

$$\Delta L^*_{200g L^{-1}} = L^*_{200g L^{-1}}(t) - L^*_{200g L^{-1}}(7^\circ \text{ dia}) \quad \text{Eq. (4.1.3)}$$

$$\Delta L^*_{100g L^{-1}} = L^*_{100g L^{-1}}(t) - L^*_{100g L^{-1}}(7^\circ \text{ dia}) \quad \text{Eq. (4.1.4)}$$

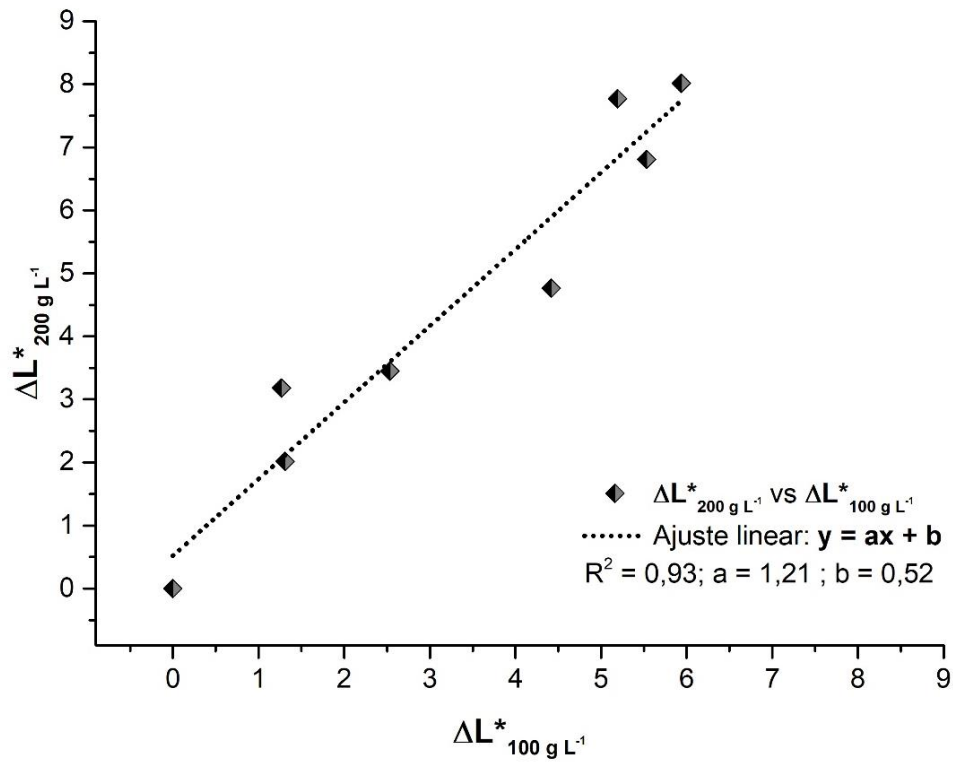
$$\Delta a^*_{200g L^{-1}} = a^*_{200g L^{-1}}(t) - a^*_{200g L^{-1}}(7^\circ \text{ dia}) \quad \text{Eq. (4.1.5)}$$

$$\Delta a^*_{100g L^{-1}} = a^*_{100g L^{-1}}(t) - a^*_{100g L^{-1}}(7^\circ \text{ dia}) \quad \text{Eq. (4.1.6)}$$

$$\Delta b^*_{200g L^{-1}} = b^*_{200g L^{-1}}(t) - b^*_{200g L^{-1}}(7^\circ \text{ dia}) \quad \text{Eq. (4.1.7)}$$

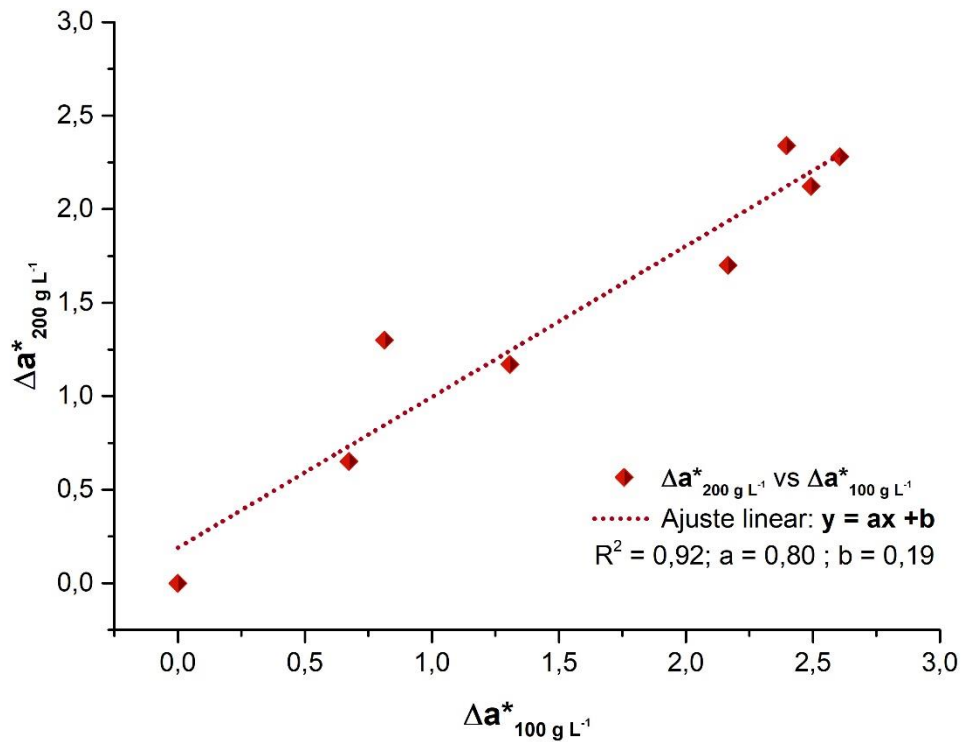
$$\Delta b^*_{100g L^{-1}} = b^*_{100g L^{-1}}(t) - b^*_{100g L^{-1}}(7^\circ \text{ dia}) \quad \text{Eq. (4.1.8)}$$

Figura 18 – Ajuste linear dos valores de $\Delta L^*_{200\text{ g L}^{-1}}$ versus $\Delta L^*_{100\text{ g L}^{-1}}$.



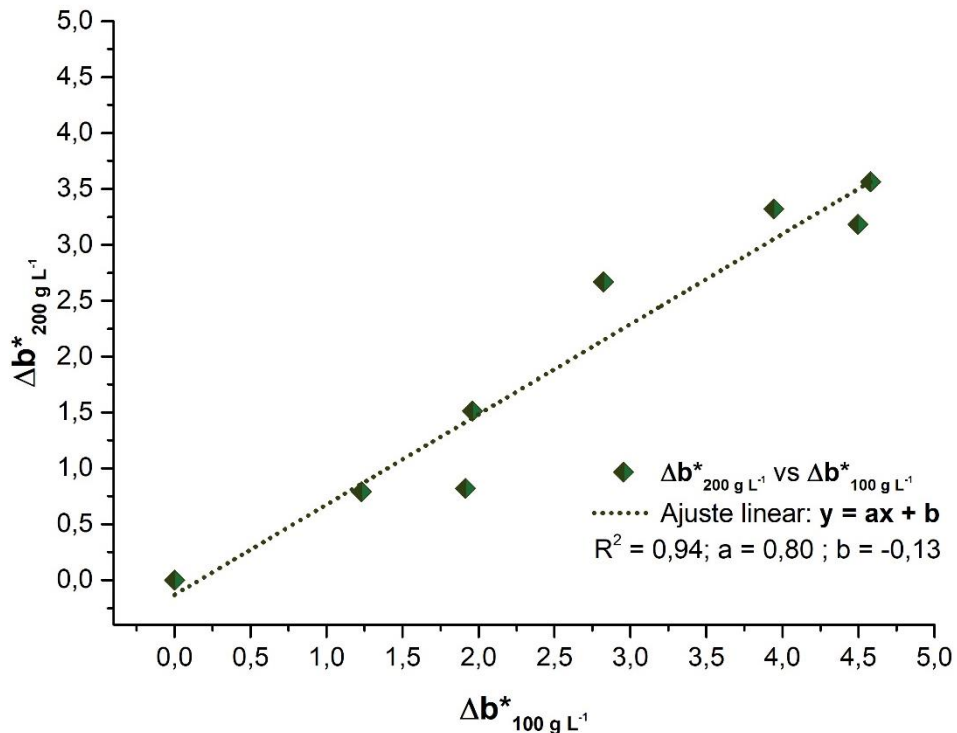
Fonte: autoria própria

Figura 19 – Ajuste linear dos valores de $\Delta a^*_{200\text{ g L}^{-1}}$ versus $\Delta a^*_{100\text{ g L}^{-1}}$.



Fonte: autoria própria

Figura 20 – Ajuste linear dos valores de $\Delta b^*_{200\text{ g L}^{-1}}$ versus $\Delta b^*_{100\text{ g L}^{-1}}$.



Fonte: autoria própria

As figuras 18, 19 e 20 passam uma noção mais quantitativa de como os parâmetros de cor se comportaram em relação a sua variação durante o processo fermentativo entre o 7º e 14º dia. Como pode ser observado nessas 3 figuras, todos os ajustes obtiveram coeficiente de determinação maiores que 0,90, que para fins cinéticos, mostra que as variações dos parâmetros de cor observadas entre as matrizes fermentativas podem ser minimamente descritas por relações lineares entre o 7º e 14º dia.

No caso, se hipoteticamente as variações dos parâmetros de cor não fossem *apenas* lineares entre as matrizes MT200 e MT100 mas tivessem também variações exatamente iguais entre si, seria observado nos ajustes lineares de cada parâmetro de cor o coeficiente angular igual a 1, condição que não é o caso dos presentes dados observados. Porém foram obtidos valores relativamente próximos a 1, no caso dos parâmetros a^* e b^* foram obtidos coeficientes angulares iguais a 0,80 o que sugere que MT200 variou os parâmetros a^* e b^* em média cerca de 20% menos que a MT100 entre o 7º e 14º dia de processo fermentativo.

O parâmetro L^* obteve de seu ajuste linear um coeficiente angular igual a 1,21, o que sugere que MT200 variou o parâmetro L^* em média cerca de 20% a mais que a MT100 entre o 7º e 14º dia de processo fermentativo. Logo pode-se concluir que as variações de cada parâmetro

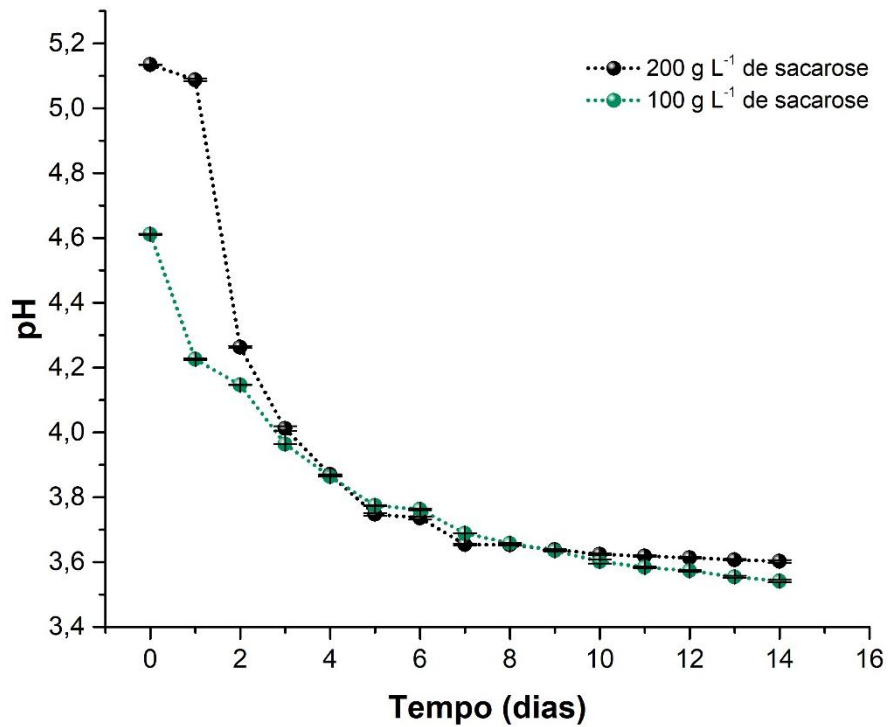
de cor entre MT200 e MT100 durante o 7º e 14º dia tiveram uma boa relação linear devido aos coeficientes de determinação para todos os ajustes de cada parâmetro de cor apresentarem valores maiores que 0,90, o que sugere que as variações dos parâmetros de cor entre as matrizes variaram de uma forma relativamente linear entre o 7º e 14º dia de processo fermentativo.

4.1.3. ANÁLISE DE pH E ACIDEZ TOTAL

A kombucha é uma bebida levemente ácida, isso ocorre devido ao mecanismo de fermentação realizado pela colônia de bactérias e leveduras característicos dessa bebida. Os produtos gerados por elas se dão por duas vias, a anaeróbia (existência de reações que não envolvem oxigênio) para formação de etanol realizadas pelas leveduras presentes (predominantemente do gênero *Saccharomyces Cerevisiae*) e a via aeróbia (existência de reações que envolvem oxigênio) em que as bactérias presentes no meio (predominantemente do gênero *Acetobacter*) promovem a oxidação do etanol gerado pelas leveduras a ácido acético (DE MIRANDA et al., 2022). Essa acidez característica da kombucha é um dos principais fatores que corroboram para boa atividade antimicrobiana e prevenção de contaminações por bactérias patogênicas nocivas à saúde humana (LEAL et al., 2018). A figura 21 mostra o comportamento do pH durante o processo fermentativo (que no caso ocorreu em condições aeróbicas) da MT200 e da MT100, é nítido que há uma grande queda dos níveis de pH nos primeiros dias de processo fermentativo e um início de estabilização dessa variável após o 7º dia, o que denota um padrão muito similar ao comportamento dos parâmetros de cor ($L^*a^*b^*$ discutidos na seção anterior) que também mostraram um comportamento mais estável nesse período após o 7º dia de processo fermentativo.

Um ponto interessante a ser destacado é a discrepância entre os valores iniciais de acidez medidos na escala de pH entre MT200 e MT100, em que a MT200 apresentou pH próximo de 5,1 enquanto MT100 apresentou um pH próximo de 4,6 no tempo 0 de processo fermentativo, isso muito provavelmente está associado a maior quantidade de açúcar presente na MT200 em relação a MT100, pois a maior quantidade de açúcar é diretamente proporcional a quantidade de grupamentos hidroxila presentes nas moléculas de sacarose que podem atuar como captadores de íons hidrogênio livres no meio. O resultado disso é a diminuição da quantidade dos íons H^+ livres comparado a um meio com menor quantidade de sacarose presente..

Figura 21 - Gráfico dos valores médios de acidez na escala de pH das matrizes durante a 1ª fermentação com \pm DP de triplicatas.



Fonte: autoria própria

A partir da observação das curvas cinéticas de pH mostradas na figura 21, foi possível verificar que a acidez total (expressa em mmol L^{-1} de hidrogênios neutralizáveis) também adotou um comportamento semelhante. No início (3º dia) do processo fermentativo se notou uma maior taxa de produção de ácidos no meio, mais especificamente do 3º ao 11º dia, e ao final do processo fermentativo essa produção mostrou-se menor em termos variação tanto para MT200 quanto para MT100. Dessa forma foi possível obter ajustes por funções sigmoidais relativamente satisfatórios ($R^2 > 0,99$) para descrever o comportamento (no intervalo de 0 a 14 dias) da formação de produtos ácidos gerados pelas bactérias em função do tempo, dispostos nas figuras 22 e 23. O modelo matemático que descreve o comportamento da acidez total está apresentado na equação (4.1.9) e os dados obtidos para cada matriz dispostos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Dados gerados pelo ajuste sigmoide apresentado na figura 22.

A_1 (mmol L^{-1})	A_2 (mmol L^{-1})	t_0 (dias)	p	R^2	R^2 ajustado
$13,0 \pm 1,7$	$95,0 \pm 7,1$	$7,9 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,3$	0,995	0,994

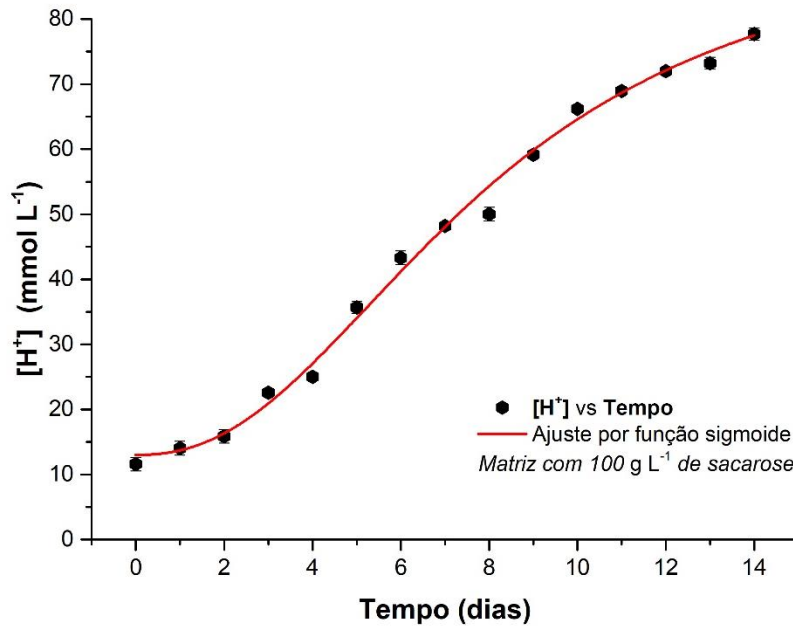
Fonte: autoria própria

Tabela 2 - Dados gerados pelo ajuste sigmoide apresentado na figura 23.

A_1 (mmol L ⁻¹)	A_2 (mmol L ⁻¹)	t_0 (dias)	p	R^2	R^2 ajustado
$7,1 \pm 1,6$	$85,1 \pm 6,1$	$7,4 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,3$	0,994	0,993

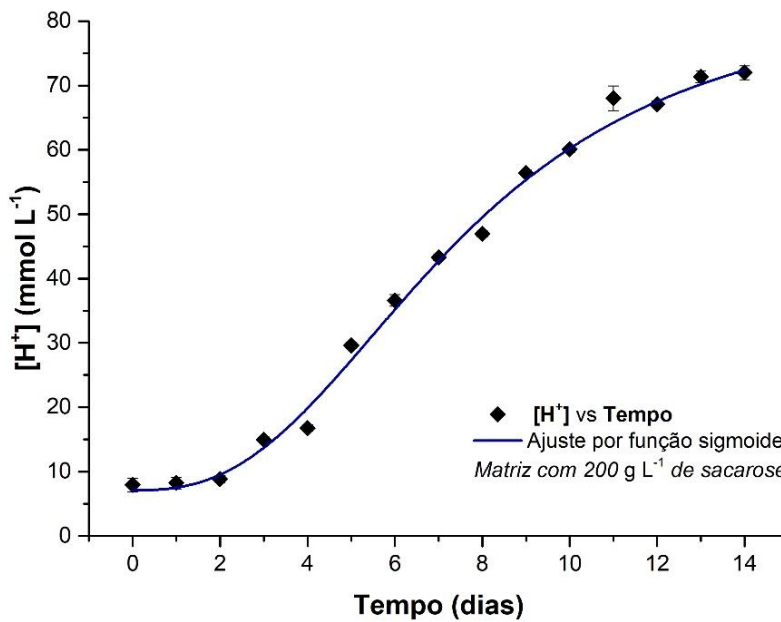
Fonte: autoria própria

Figura 22 – Gráfico dos valores médios de acidez total de MT100 com \pm DP de triplicatas e ajuste sigmoide em função do tempo.



Fonte: autoria própria

Figura 23 – Gráfico dos valores médios de acidez total de MT200 com \pm DP de triplicatas e ajuste sigmoide em função do tempo.



Fonte: autoria própria

Como pode ser observado nas figuras 22 e 23 o comportamento da acidez total tanto para MT100 e MT200 segue de maneira muito próxima o comportamento descrito por funções simoidais, funções as quais modelam de maneira satisfatória o comportamento de muito processos microbiológicos, como fermentações alcoólicas promovidas por leveduras (BORZANI et al., 2001) e atividade de microrganismos (FLORENTINO; BISCARO; PASSOS, 2010) que também convertem sacarídeos em outros produtos.

Esse padrão de comportamento sigmoideal na produção de ácidos durante o processo fermentativo, muito provavelmente está associado com o período inicial de incubação dos microrganismos e a produção de substratos que devem preceder algumas vias metabólicas das bactérias do gênero *acetobacter* e *gluconobacter*. Essas bactérias só são capazes de produzir ácido acético (que trata-se do componente ácido que majoritariamente mais agrega acidez a bebida durante os primeiros dias de processo fermentativo) na presença de etanol, o qual é previamente gerado no meio pelas leveduras (que também fazem parte desse consórcio simbiótico) através da conversão de sacarose em glicose e frutose pela enzima invertase, e posteriormente, depois de passar por uma complexa via metabólica, gera o etanol e outros produtos (DE MIRANDA et al., 2022).

Logo depois dessa fase inicial (até o 2º dia) a qual não se observa baixas variações na acidez total de ambas as matrizes, o sistema passa a produzir ácidos a taxas maiores que as iniciais, fenômeno que possivelmente está associado a maior quantidade de etanol que tenha sido produzido e disposto no meio, servindo de substrato para as bactérias acéticas aumentarem a sua população e promoverem a oxidação do mesmo pela via aeróbica. Vale ressaltar, que no 4º dia de processo fermentativo já era nítido a visualização do novo biofilme de celulose (SCOBY) na superfície do recipiente, que passou a se apresentar mais espesso a cada dia. Isso muito provavelmente contribuiu para uma menor concentração de oxigênio solubilizado no meio, fazendo com que nos dias posteriores, no caso o 11º dia, a produção de ácidos prosseguisse a taxas/velocidades menores que durante o meio do processo fermentativo (COELHO et al., 2020), gerando assim esse padrão cinético de comportamento que pode ser observado nas figuras 22 e 23 e que é relativamente bem descrito pela função sigmoide.

$$[H^+](t) = \frac{A_1 - A_2}{1 + (t/t_0)^p} + A_2 \quad \text{Eq. (4.1.9)}$$

Para fins comparativos, foram calculadas as derivadas primeiras (funções velocidade), derivadas segundas (funções aceleração) e o tempo em que o sistema atingiu a velocidade máxima de produção de ácidos partindo dos dados das funções de ajuste sigmoideal (mostrados nas tabela 1 e 2) de cada matriz (cujo estão dispostas nas equações (4.1.10), (4.1.11) e (4.1.12) respectivamente e os dados apresentados graficamente nas figuras 24 e 25), com o intuito de se observar de maneira aproximada, porém mais quantitativa, como se comportou em termos cinéticos a formação de tais produtos ácidos (ácidos acético, láctico, glucónico, glucurônico e uma diversidade de outros ácidos que podem estar presentes a depender do substrato e cultura utilizada), que por sua vez são os componentes que trazem uma característica imprescindível da bebida e do processo fermentativo (DE MIRANDA et al., 2022), para assim comparar as diferenças cinéticas obtidas entre MT200 e MT100.

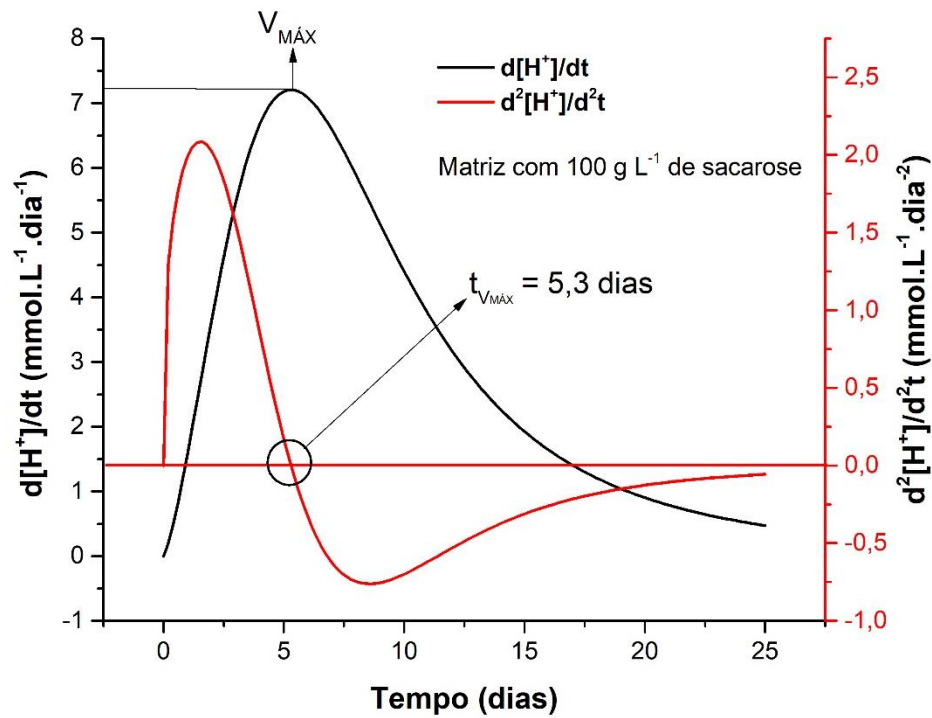
$$\frac{d[H^+](t)}{dt} = \frac{p \cdot (A_2 - A_1) \cdot \left(\frac{t}{t_o}\right)^{p-1}}{t_o \cdot \left(1 + \left(\frac{t}{t_o}\right)^p\right)^2} \quad \text{Eq. (4.1.10)}$$

$$\frac{d^2[H^+](t)}{d^2t} = \frac{2 \cdot \left(\frac{t}{t_o}\right)^{2 \cdot (p-1)} - (1 - 1/p) \cdot \left(\frac{t}{t_o}\right)^{p-2} \cdot \left(1 + \left(\frac{t}{t_o}\right)^p\right)}{\left(\left(\frac{t}{t_o}\right)^2 \cdot (A_1 - A_2)\right)^{-1} \cdot \left(1 + \left(\frac{t}{t_o}\right)^p\right)^3} \quad \text{Eq. (4.1.11)}$$

$$\text{para } \frac{d^2[H^+](t)}{d^2t} = 0 \rightarrow t_{V_{MÁX}} = \left(\frac{1 - (1/p)}{1 + (1/p)}\right)^{\frac{1}{p}} \cdot t_o \quad \text{Eq. (4.1.12)}$$

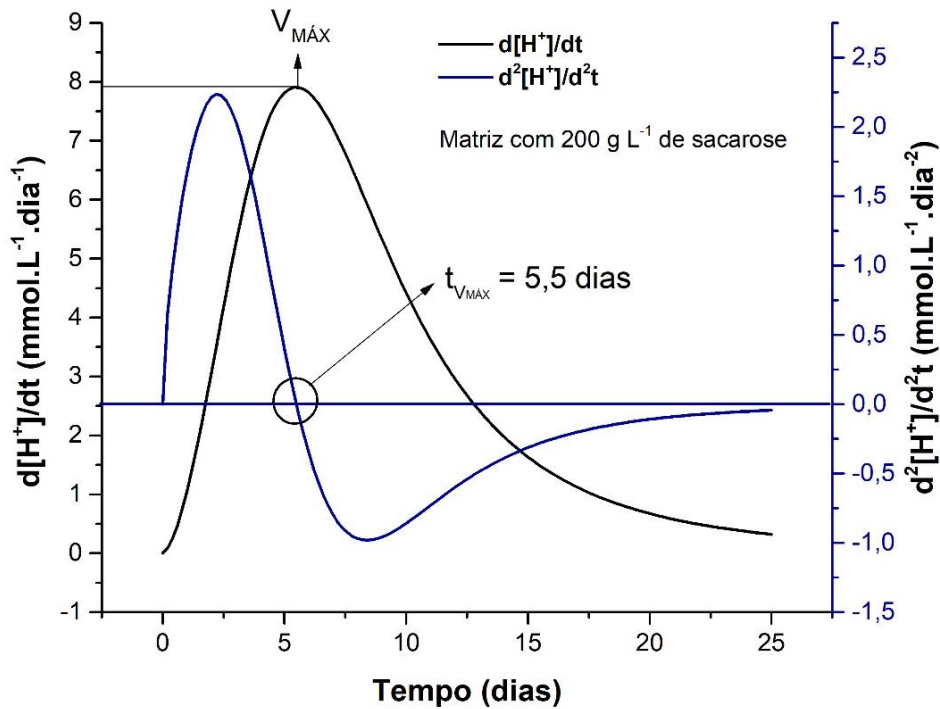
As figuras 23 e 24 mostram o comportamento da velocidade (1ª derivada) e aceleração (2ª derivada) da produção de ácidos em relação ao tempo descritas pelas equações (4.1.11) e (4.1.12). Nessas figuras é possível verificar que o sistema para ambas as matrizes atinge uma velocidade de pico entre o 4º e 6º dia de processo fermentativo. O cálculo do tempo “ $t_{V_{MÁX}}$ ” (o qual está evidenciado nas figuras 23 e 24) em que os sistemas atingem a velocidade de pico/máxima, pode ser obtido encontrando-se o ponto de derivada igual 0 (sendo esse um ponto de máximo global da função velocidade e abcissa da função aceleração) da função velocidade ($d[H^+]/dt$), dessa forma é necessário encontrar a abcissa da função aceleração de produção de ácidos ($d^2[H^+]/d^2t = 0$), cujo a solução é dada pela equação (4.1.12).

Figura 23 – Gráfico da 1ª e 2ª derivada da função sigmoidal obtida pelo ajuste dos dados de acidez total da MT100.



Fonte: autoria própria

Figura 24 – Gráfico da 1ª e 2ª derivada da função sigmoidal obtida pelo ajuste dos dados de acidez total da MT200.



Fonte: autoria própria

Substituindo os valores da tabela 1 e 2 na equação (4.1.12) e realizando os cálculos chega-se respectivamente em “ $t_{V_{MÁX}} = 5,3$ dias” para MT100 e “ $t_{V_{MÁX}} = 5,5$ ” para MT200, que no caso tratam-se dos valores de tempo que cada matriz levou para atingir a velocidade pico/máxima de produção de ácidos no sistema fermentativo. A velocidade de pico foi atingida entre o 4º e 6º dia de fermentação para ambos os sistemas fermentativos. Portanto, pode-se concluir que tanto MT100 e MT200 atingiram uma certa condição de alta eficiência entre o 4º e 6º dia de processo fermentativo. Os motivos para isso podem ser diversos, como pH ótimo para atividade catalítica da enzimas envolvidas no processo fermentativo, crescimento populacional das bactérias e leveduras presentes no meio, e como mencionado anteriormente, a disponibilidade de substratos precursores para formação de alguns ácidos e a disponibilidade de oxigênio (associados as reações de oxidação de álcoois) presente no sistema fermentativo, todas essas variáveis são determinantes na cinética das reações bioquímicas promovidas pelos microrganismos presentes no sistema.

Após o dia da velocidade de pico, ambos os sistemas fermentativos passam a desacelerar até atingir uma condição relativamente mais estacionária como pode ser observado na função velocidade de maneira mais nítida. Esse padrão pode observado nos parâmetros de pH, e nos parâmetros cor $L^*a^*b^*$ discutidos na seção anterior que também adotaram um padrão de variação similar entre as matrizes após o 7º dia de processo fermentativo. Esses pontos fortalecem ainda mais a hipótese de que exista um certo fator limitante no processo fermentativo que faz com que a velocidade de produção de ácidos varie dessa forma, e que esse fator possa ou não estar associado a concentração de sacarose presente no meio fermentativo, pois como pôde ser visto, a MT100 atingiu a velocidade de pico e um tempo menor que a MT200, fato que poderia ser explicado pela menor solubilidade de gás oxigênio em decorrência da maior concentração de sacarose no ambiente fermentativo. Porém **não** é possível fazer tal afirmação, pois apesar do modelo matemático proposto para descrever o comportamento da produção de ácidos em função do tempo ser relativamente satisfatório (ou seja, ter coeficientes de determinação maiores que 0,99, que de uma perspectiva matemática indica que 99% da variação dos dados pode ser descrita pelo modelo proposto) seriam necessários mais acompanhamentos para verificar a reprodutibilidade desses valores e saber se há, ou não, diferença significativa entre os tempos em que cada matriz atinge a velocidade de pico.

4.2. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA 2ª FERMENTAÇÃO

Nas tabelas 3 e 4 estão dispostos os dados dos parâmetros físico-químicos da 2ª fermentação para MT100 e MT200 respectivamente, apesar de não existirem muitos dados na literatura do processo fermentativo após a fase de carbonatação, essa versão da bebida é a mais comumente comercializada, muito provavelmente pelo fato de que maiores concentrações de CO₂ na bebida deixem sua condição sensorial mais interessante e agradável para os consumidores.

No processo de 2ª fermentação pode-se, ou não, haver uma etapa de “saborização”, no caso deste trabalho, a 2ª fermentação foi realizada apenas com o envase para um ambiente anaeróbico, do líquido fermentado por 7 dias de cada matriz com diferentes concentrações de sacarose (100 e 200 g L⁻¹), sem adição de qualquer componente. Analisando os valores dispostos na tabela 3 obtidos para matriz com concentração de 100 g L⁻¹ de sacarose, pode-se notar que não houve grandes variações de cada parâmetro físico-químico, principalmente em relação aos parâmetros de cor, SST e pH. Contudo é interessante pontuar que durante esse processo os conteúdos ácidos muito provavelmente sofreram algum tipo de degradação, pois o parâmetro acidez total (AT) diminuiu após 7 dias de fermentação em meio anaeróbico.

Analisando agora os valores dispostos na tabela 3 obtidos para matriz com concentração de 200 g L⁻¹ de sacarose, pode-se notar que também não houve grandes variações de cada parâmetro físico-químico, principalmente em relação aos parâmetros de cor e pH, já que nesse caso o conteúdo de SST diminuiu, diferentemente da MT100. Fato que sugere um maior consumo de sacarose durante esse período em relação a MT100. Nesse caso também é possível notar que durante esse tempo os conteúdos ácidos muito provavelmente também sofreram algum tipo de degradação, pois o parâmetro acidez total diminuiu após 7 dias de fermentação em meio anaeróbico.

Tabela 3 – Valores das médias dos parâmetros físico-químicos para 2ª fermentação proveniente da MT100 ± DP de triplicatas da matriz de concentração de 100 g L⁻¹.

Tempo	SST (°Brix)	pH	AT (mmol L ⁻¹)	L*	a*	b*
Dia 0	10,4 ± 0,06	3,689 ± 0,003	48,2 ± 0,5	8,11 ± 0,04	4,84 ± 0,04	4,52 ± 0,01
Dia 7	10,5 ± 0,06	3,682 ± 0,005	45,7 ± 0,9	9,13 ± 0,21	5,11 ± 0,09	5,03 ± 0,12

Fonte: autoria própria

Tabela 4 – Valores das médias dos parâmetros físico-químicos para 2ª fermentação proveniente da MT200 ± DP de triplicatas.

Tempo	SST (°Brix)	pH	AT (mmol L ⁻¹)	L*	a*	b*
Dia 0	19,0 ± 0,06	3,655 ± 0,003	43,3 ± 0,5	10,94 ± 0,03	5,32 ± 0,02	5,85 ± 0,02
Dia 7	18,6 ± 0,06	3,661 ± 0,003	48,8 ± 1,0	9,70 ± 0,07	4,13 ± 0,04	4,88 ± 0,04

Fonte: autoria própria

4.3. ANÁLISE DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos estão presentes em uma vasta quantidade de alimentos nas mais diversas proporções. Eles são chamados de antioxidantes pelo fato de terem a capacidade de capturarem radicais livres como oxigênio singlete (¹O₂), superóxido (O₂[•]), hidroxila (OH[•]) e peróxido de hidrogênio, que são os principais radicais livres liberados nas mitocôndrias durante processo de respiração celular através da cadeia transportadora de elétrons (BIRBEN et al., 2012). Durante esse processo cerca de 2 a 5% do O₂ metabolizado nas mitocôndrias é desviado para outras vias metabólicas e reduzido a sua forma univalente (O₂[•]), dando assim origem aos radicais livres de oxigênio. A produção de radicais livres é uma consequência inerente aos processos metabólicos, sendo que o próprio organismo tem meios de combater e equilibrar esse sistema para mitigar danos causados por tais compostos. Contudo, quando se há um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes em direção a formação de um excesso de radicais livres acontece o chamado *estresse oxidativo* (BARBOSA et al., 2010). Essa é uma condição que pode estar associada ao desenvolvimento de várias enfermidades como disfunção cerebral, cardiopatias, enfisema, artrite, aterosclerose, diabetes, catarata, esclerose múltipla, inflamações crônicas, câncer, doenças do sistema imune e o próprio envelhecimento (BIANCHI, M. P. ANTUNES, 1999).

A kombucha passa a ser mais interessante que o chá não fermentado, pois vários estudos relataram que há um aumento do teor de fenólicos totais após a bebida passar pelo processo fermentativo (JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). Jayabalan et al. (2008) relataram que o aumento do teor de compostos fenólicos totais em kombucha de chá verde e chá preto se dava por um mecanismo de biotransformação de alguns compostos fenólicos da classe das catequinas que são caracteristicamente mais abundantes na camélia sinensis. Nesse trabalho foi relatado que as *epigallocatequinas galato* eram convertidas em

epicatequinas galato e epicatequinas, aumentando assim não apenas o teor de compostos fenólicos mas também a atividade antioxidante da bebida (JAYABALAN et al., 2008).

Figura 25 – Valores médios do teor de fenólicos totais para MT100 com \pm DP de triplicatas.

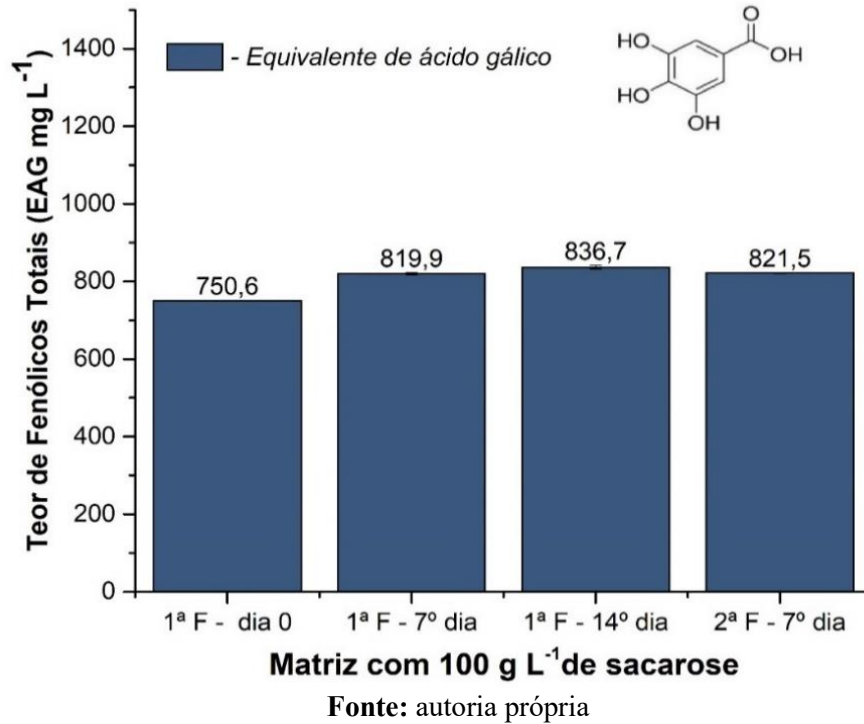
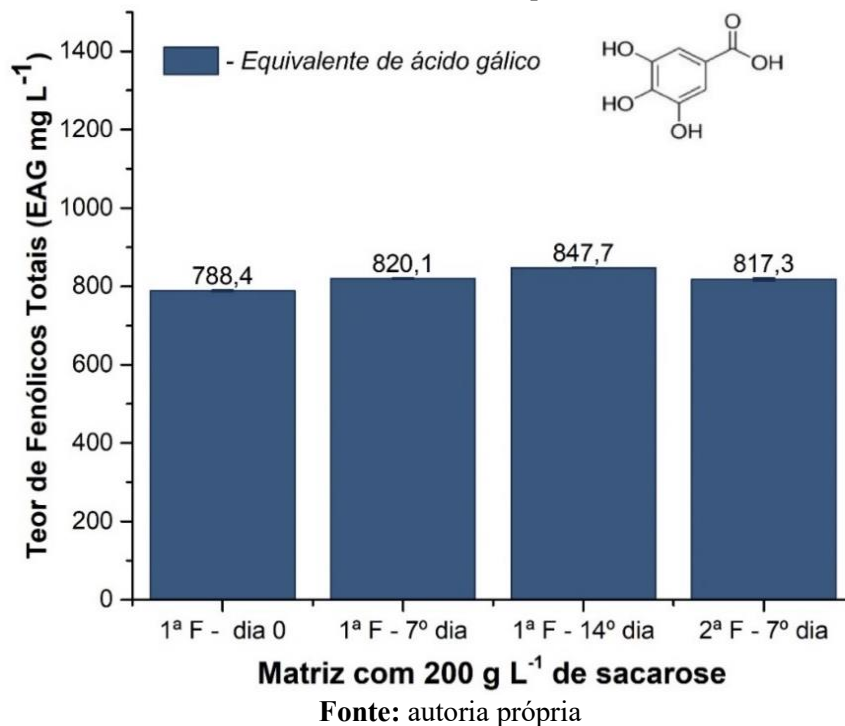


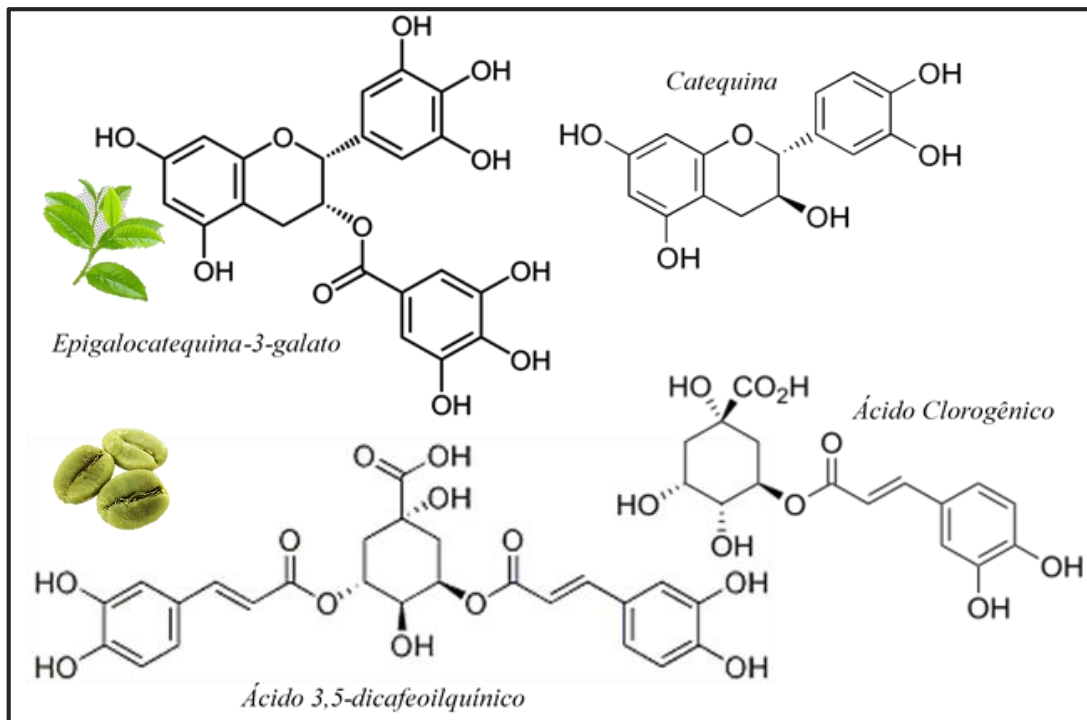
Figura 26 – Valores médios do teor de fenólicos totais para MT200 com \pm DP de triplicatas.



Um ponto que contribui com a alta concentração de compostos fenólicos na bebida é o fato evidenciado pelo trabalho de Zhu et al. (1997) que estudou a estabilidade de catequinas em chá verde, evidenciou que as catequinas são pouco estáveis em meio alcalino (pH = 7,4), porém possuem boa estabilidade em termos de degradação em meio ácido (pH = 4,9) (ZHU et al., 1997). Dessa forma é notório concluir que a kombucha com sua acidez característica traz consigo um ambiente perfeito para estocagem e estabilidade de compostos fenólicos.

O café por sua vez possui vários compostos antioxidantes, sendo o mais abundante deles o ácido clorogênico o qual está apresentado na figura 27 sendo comparado com a epigalo-3-catequina galato, catequina e seu variante diesterificado o ácido 3,5-dicafeoilquínico. Na figura 27 é possível notar que há certas semelhanças entre as estruturas dos compostos fenólicos existentes no chá verde e no café verde, o que seria plausível sugerir que as mesmas biotransformações nas moléculas de *epigalocatequinas galato* para *epicatequinas galato* e *epicatequinas* promovidas pelos microrganismos durante o processo fermentativo, como relatado por Jayabalan et al (2008), ocorram de forma similar nos compostos fenólicos presentes no café, sendo que esses também possuem grupamentos ésteres que se ligam aos anéis aromáticos de forma semelhante.

Figura 27 – Estruturas da epigalocatequina-3-galato, catequina, ácido clorogênico e ácido 3,5-dicafeoilquínico



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Como pode ser observado nas figuras 25 e 26, os valores de compostos fenólicos totais obtidos para as matrizes de café verde não demonstraram uma variação tão grande quanto os obtidos por Kallel et al. (2012) na versão de chá verde (*camélia sinensis*) da bebida, relatando valores de 780 mg L⁻¹ EGA no dia 0 e 1080 mg L⁻¹ EAG após 15 dias de processo fermentativo, representando assim uma variação de 38,5 % de aumento (KALLEL et al., 2012).

Contudo, é interessante pontuar que apesar da baixa variação de compostos fenólicos presentes nas matrizes fermentativas de café verde 100% arábica, a MT200 apresentou um teor de compostos fenólicos maior que a MT100, essa condição possivelmente está associada ao fato de ter se adicionado uma maior quantidade de açúcar demerara na MT200, pois o açúcar demerara já traz em sua composição uma certa quantidade de compostos fenólicos provenientes da cana de açúcar como comentado em seções anteriores. Os valores obtidos para as 2^{as} fermentações de MT200 e MT100 se mostraram relativamente invariáveis em relação ao 7º dia de fermentação (dia o qual foi feito o envase das mesmas para 2ª fermentação). Esse fato certamente sugere que os mecanismos de biotransformação dos compostos fenólicos não sejam muito favorecidos em um ambiente anaeróbico.

4.4. ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO

O etanol é um dos precursores fundamentais para formação do ácido acético na kombucha, que é um dos principais componentes utilizado pelas bactérias acéticas presentes na cultura (predominantemente gênero *gluconoacetobacter xylinus*) (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). A via metabólica de produção do etanol e CO₂ a partir da sacarose (cujo está associado predominantemente as leveduras do gênero *saccharomyces*), se dá pelo catabolismo das moléculas de glicose e frutose que envolve 12 reações bioquímicas em sequência ordenada, onde cada uma delas é catalisada por uma enzima específica. De maneira resumida os açúcares (glicose e frutose provindos da molécula de sacarose) são convertidos a piruvato, e nesse ponto o piruvato é convertido pelas enzimas piruvato descarboxilase a acetaldeído. Ao final da cadeia de reações bioquímicas o acetaldeído é reduzido a etanol mais CO₂ e 2 moléculas de ATP (fonte de energia das leveduras) pela enzima álcool desidrogenase (BORZANI et al., 2007).

Dentre os diversos produtos orgânicos que estão presentes na bebida fermentada, o etanol não é apenas de interesse das bactérias acéticas, mas possui também grande interesse do CONTRAN (Conselho Nacional de Trânsito), o qual trata-se do órgão máximo normativo

consultivo do Sistema Nacional de Trânsito brasileiro, ele elabora diretrizes da Política Nacional de Trânsito e coordena todos os órgãos do Sistema Nacional de Trânsito (SNT) (TRANSPORTES, [s.d.]). Atualmente em todo o território nacional se vigora a Lei Seca cujo é identificada como **LEI Nº 11.705 DE 19 DE JUNHO DE 2008** que segundo a constituição federal,

“Art. 1º Esta Lei altera dispositivos da *Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997*, que institui o Código de Trânsito Brasileiro, com a finalidade de estabelecer alcoolemia 0 (zero) e de impor penalidades mais severas para o condutor que dirigir sob a influência do álcool”

Como é descrito na Constituição Federal brasileira a Lei Seca aplica várias penalidades para condutores que incorram nas condições da mesma, de forma mais detalhada a Lei Seca prediz como crime, previsto no art. 306 do CTB (Código de Trânsito Brasileiro) que o condutor que tiver “*exame de sangue que apresente resultado igual ou superior a 6 (seis) decigramas de álcool por litro de sangue (6 dg/L)*” (INCISO I) ou tiver “*teste de etilômetro com medição realizada igual ou superior a 0,34 miligramas de álcool por litro de ar alveolar expirado (0,34 mg/L)*” (INCISO II). E como infração administrativa previsto no art. 165 do CTB o condutor que tiver “*exame de sangue que apresente qualquer concentração de álcool por litro de sangue*” (INCISO I) ou tiver “*teste de etilômetro com medição realizada igual ou superior a 0,05 miligrama de álcool por litro de ar alveolar expirado (0,05 mg/L)*” (INCISO II).

A kombucha em sua versão tradicional não é originalmente apresentada ou comercializada como uma bebida alcoólica, até mesmo pelo fato de que o consumo excessivo de álcool está associado com diversos quadros maléficos a saúde humana como esteatose hepática, cirrose, alguns tipos de câncer, acidente vascular cerebral, transtornos mentais, entre outros (COSTA et al., 2004), algo que vai na total contramão do pretexto pelo qual a kombucha tenho ganhado cada vez mais popularidade (COELHO et al., 2020).

Os parâmetros de qualidade e boas práticas de fabricação exigidos pela legislação brasileira na produção e comercialização de kombucha, que foram revisados pelo Ministério da Agricultura pela última vez no ano de 2019 para regulamentação da bebida, originaram a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019, que diz explicitamente que a bebida fermentada apenas pode ser comercializada como **não alcoólica** se possuir graduação alcoólica menor que 0,5% (v/v) (ou °GL), e comercializada como **zero álcool** se possuir graduação alcoólica menor que 0,05% (v/v), sendo que as bebidas com graduação alcoólica até 0,5% (v/v) devem possuir no rótulo principal a frase “*Pode conter álcool em até*

0,5% v/v” conforme exige a lei (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA; MAPA, 2019). Nas figuras 28 e 29, estão dispostos os dados de teor alcoólico obtidos para o 7º e 14º dias de processo fermentativo para as 1ªs fermentações de MT100 e MT200 (designado abaixo de cada

Figura 28 – Valores médios de teor alcoólico obtido para MT100 com \pm DP de triplicatas.

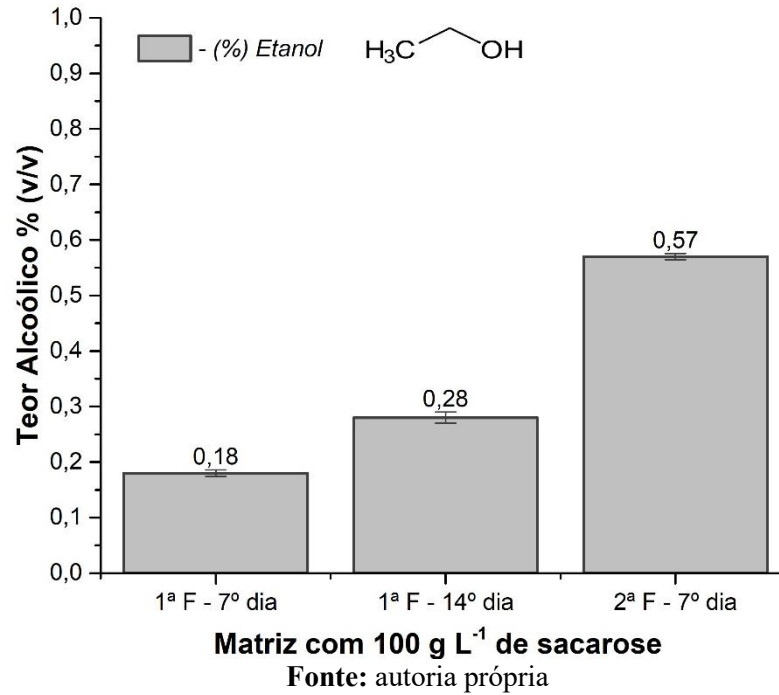
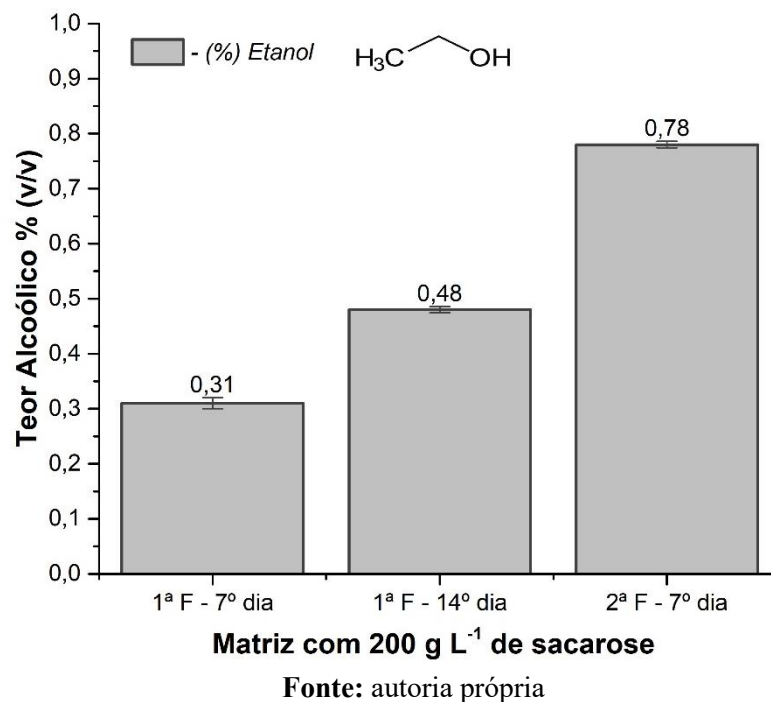


Figura 29 – Valores médios de teor alcoólico obtido para MT200 com \pm DP de triplicatas.



barra como “1ª F – 7º dia” e “1ª F – 14º dia”), e para o 7º dia das 2ªs fermentações de MT100 e MT200 (designado abaixo de cada barra como “2ª F – 7º dia”, sendo que o dia 0 para as 2ªs fermentações são equivalentes aos 7ºs dias das 1ªs fermentações, ou seja, “2ªF - dia 0” = “1ª F -7º dia”) respectivamente.

Pode-se notar nas figuras 28 e 29 que os valores apresentados para a MT200 são relativamente muito maiores que os valores de teor alcoólico obtidos para MT100, o que fortemente sugere que uma maior concentração de açúcar presente no meio durante o processo fermentativo seja uma variável diretamente proporcional ao teor alcoólico que será adquirido pela bebida, ressaltando que essa condição pode variar a depender do substrato e cultura utilizados para o desenvolvimento da mesma (DE MIRANDA et al., 2022).

Discutindo os dados das figuras 28 e 29 de maneira mais específica e quantitativa, visando compara-los para cada matriz fermentativa no âmbito inter e intra matrizes e também em relação a variável tempo, chega-se nas seguintes conclusões. Começando pelas 1ªs fermentações, MT200 obteve um valor 72,2% maior que MT100 para o 7º dia da 1ª fermentação e um valor de 71,4% maior que MT100 para o 14º dia da 1ª fermentação.

Fazendo agora uma comparação intra-matrizes com relação a variável tempo, MT100 teve um aumento de 55,6% do 7º para o 14º dia de fermentação, já MT200 teve um aumento de 54,8% do 7º para o 14º dia de fermentação. Logo todos dados tanto da perspectiva inter-matrizes e intra-matrizes, chega-se na conclusão que as matrizes variaram seu teor alcoólico ao longo do tempo de maneira proporcional entre si. Esse fato fortalece muito a hipótese de que uma maior concentração de sacarose no meio gera proporcionalmente um maior teor alcoólico da bebida, podendo essa, ser até mesmo uma relação linear (concentração de sacarose versus teor alcoólico), porém não é possível fazer tal afirmação pois seriam necessários mais dados para se obter uma maior clareza dessa condição.

Agora analisando a variação de teor alcoólico obtida para às 2ªs fermentações, tem-se que na perspectiva inter-matrizes MT200 obteve um valor 36,8% maior que MT100 para o 7º dia da 2ª fermentação, e da perspectiva intra-matrizes com relação a variável tempo, MT100 teve um aumento de 216,7% do dia 0 para o 7º dia de processo fermentativo, já MT200 teve um aumento de 151,6% do dia 0 para o 7º dia de processo fermentativo, contudo, em valores brutos (0,78% (v/v) para MT200 e 0,57% (v/v) para MT100). Assim, fica notório que maiores concentrações de sacarose contribuem ainda mais para produção de etanol em condições

anaeróbicas, condições as quais agem como um potencializador para produção e acúmulo de etanol no meio. Logo, fica evidente que a via aeróbica pela qual as bactérias do gênero *acetobacter* atuam convertendo etanol em ácido acético, são de fundamental importância para controlar o acúmulo excessivo de etanol no meio através de seu consumo.

No caso das kombuchas de café verde 100% arábica produzidas no presente trabalho, pode-se observar que apenas as que passaram pela segunda fermentação seriam consideradas bebidas alcoólicas perante a legislação vigente (teor alcoólico percentual maior que 0,5% (v/v)).

Para fins demonstrativos, e para se ter uma noção muito aproximada de quanto seria necessário ingerir de cada bebida fermentada apresentadas nas figuras 28 e 29 para se incorrer nas condições dos artigos 165 e 306 que estão previstos como infração e crime respectivamente no Código de Trânsito Brasileiro (CTB), suponha e baseie-se no seguinte questionamento: “qual seria o volume necessário a ser ingerido (em litros) (V_{IG}) de cada kombucha situada nas figuras 28 e 29 para que um indivíduo adulto com peso corporal de 70 kg incorresse nas condições de infração (0,1 grama de etanol por litro de sangue) e crime (0,7 gramas de etanol por litro de sangue) previsto no CTB caso realizasse o teste em um etilômetro exatamente 1 hora após a ingestão?”

É possível realizar esse cálculo através da equação (4.4.1) tendo-se os valores de teor alcoólico percentual (v/v) da bebida ingerida ($TA\%$), a densidade do etanol a 20°C (ρ_{Et-OH}), o peso em kg do indivíduo (P) (considerando que haja 75 mL de sangue por kg corporal), taxa de metabolização do etanol em $g L^{-1} h^{-1}$ (no caso $1,5 g L^{-1} h^{-1}$ de etanol), o tempo entre a ingestão da bebida e a medição pelo etilômetro (Δt_m) em horas e as concentrações limites de etanol no sangue previstas no CTB (C_{Et-OH}) em $g L^{-1}$.

$$V_{IG} = \frac{7,5 \times 10^{-3} \times P}{TA\% \times \rho_{Et-OH}} \times (C_{Et-OH} + 1,5 \times \Delta t_m) \quad \text{Eq. (4.4.1)}$$

Um ponto interessante a se comentar é que as medidas realizadas pelo etilômetro só fazem sentido no contexto de se saber se um indivíduo possui álcool na corrente sanguínea, ou não, pelo fato de que o ar expelido pelos pulmões está em equilíbrio líquido-vapor com a corrente sanguínea, e dessa forma a concentração de etanol presente no ar expelido pelos pulmões é diretamente proporcional a concentração do mesmo na fase líquida (corrente sanguínea) como é descrito pela Lei de Henry (JONES; COWAN, 2020).

Na tabela 5 estão dispostos cálculos de volume (em litros) a ser ingerido por um indivíduo adulto de 70 kg das bebidas de cada uma das composições alcoólicas obtidas nas figuras 28 e 29 para se incorrer nos artigos 165 (infração administrativa) e 306 (crime) previstos no CTB. Assim, pode ser observado na tabela 5 que os valores de kombucha a serem ingeridos nas condições hipotéticas estabelecidas, são relativamente altos, valores os quais provavelmente a maior parte da população não costuma ingerir. Isso mostra que kombuchas com teor alcoólico abaixo de 0,5% (v/v) possivelmente não trarão grandes problemas no que se diz respeito ao cumprimento da lei. Entretanto, pessoas que se encontram em um grupo de risco associado a ingestão de álcool, como mulheres grávidas (síndrome alcoólica fetal) e pessoas que tenham doenças que possam ser agravadas pelo consumo do mesmo, devem estar conscientes das características composicionais da bebida fermentada.

Nos Estados Unidos (onde a legislação a respeito da bebida é muito similar à do Brasil) Talebi et al. (2017) avaliaram o teor alcoólico de várias kombuchas comerciais e descobriram que várias delas, que no rótulo se enquadravam como não alcoólicas (teor alcoólico menor que 0,5%(v/v)), apresentaram um teor alcoólico maior que 1% (TALEBI et al., 2017), com isso pode-se concluir que além das exigências da lei é necessário que os próprios consumidores da bebida saibam que este componente presente nela (etanol) pode vir a atingir valores relativamente maiores do que o esperado.

Tabela 5 – Valores calculados de volume de kombucha a ser ingerido (V_{IG}), obtidos da eq. (4.4.1).

Matriz	Período fermentativo	V_{IG} (L) art. 165	V_{IG} (L) art. 306
MT100	$1^{a}F - 7^{\circ} dia \rightarrow 0,18\%(v/v)$	5,91	8,13
	$1^{a}F - 14^{\circ} dia \rightarrow 0,28\%(v/v)$	3,80	5,23
	$2^{a}F - 7^{\circ} dia \rightarrow 0,57\%(v/v)$	1,86	2,56
MT200	$1^{a}F - 7^{\circ} dia \rightarrow 0,31\%(v/v)$	3,43	4,72
	$1^{a}F - 14^{\circ} dia \rightarrow 0,48\%(v/v)$	2,22	3,05
	$2^{a}F - 7^{\circ} dia \rightarrow 0,78\%(v/v)$	1,37	1,88

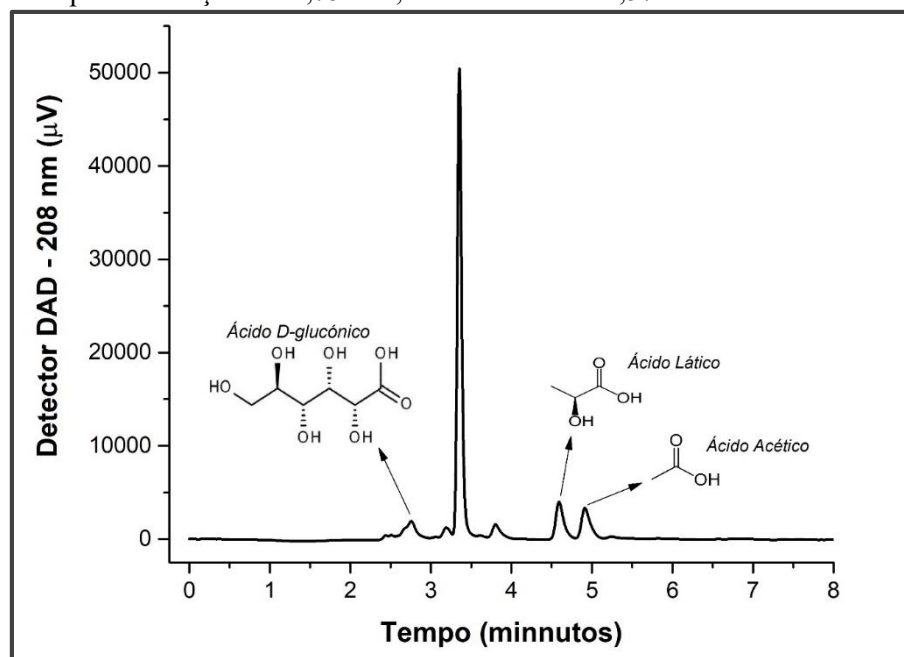
Fonte: autoria própria

4.4. ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos presentes na kombucha são diversos e são produzidos nas mais diferentes proporções a depender do substrato e principalmente da cultura de bactérias e leveduras utilizada no processo fermentativo, sendo já relatados na literatura a presença do ácido acético, ácido D-glucônico, ácido glucurônico, ácido lático, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido malônico e ácido oxálico.

A figura 30 mostra o perfil cromatográfico da amostra de 7º dia da matriz de fermentação de concentração de 100 g L⁻¹ de sacarose. Nela é possível identificar os picos de cada ácido quantificado e apresentado neste trabalho. Alguns picos entre os picos dos ácidos quantificados não foram identificados. Contudo, possivelmente esses picos podem ser relativos a outros ácidos ou até mesmo vitaminas provenientes do café que também absorvem nessa região do espectro ultravioleta.

Figura 30 – Cromatograma de uma amostra exemplar dos ácidos analisados por CLAE, ácido D-glucônico com tempo de retenção em 2,75 min, ácido lático em 4,57 min e ácido acético em 4,89 min.



Fonte: autoria própria

No presente trabalho foi realizado a quantificação do ácido acético, lático e D-glucônico (sendo esse último o principal precursor do ácido glucurônico, que por sua vez possui alta capacidade de desintoxicação hepática). Nas figuras 31, 32, 33, 34, 35 e 36 estão dispostos como gráficos de barra a quantidade de cada ácido analisado no presente trabalho.

Figura 31 – Valores médios de ácido acético obtidos para MT100 com \pm DP de triplicatas.

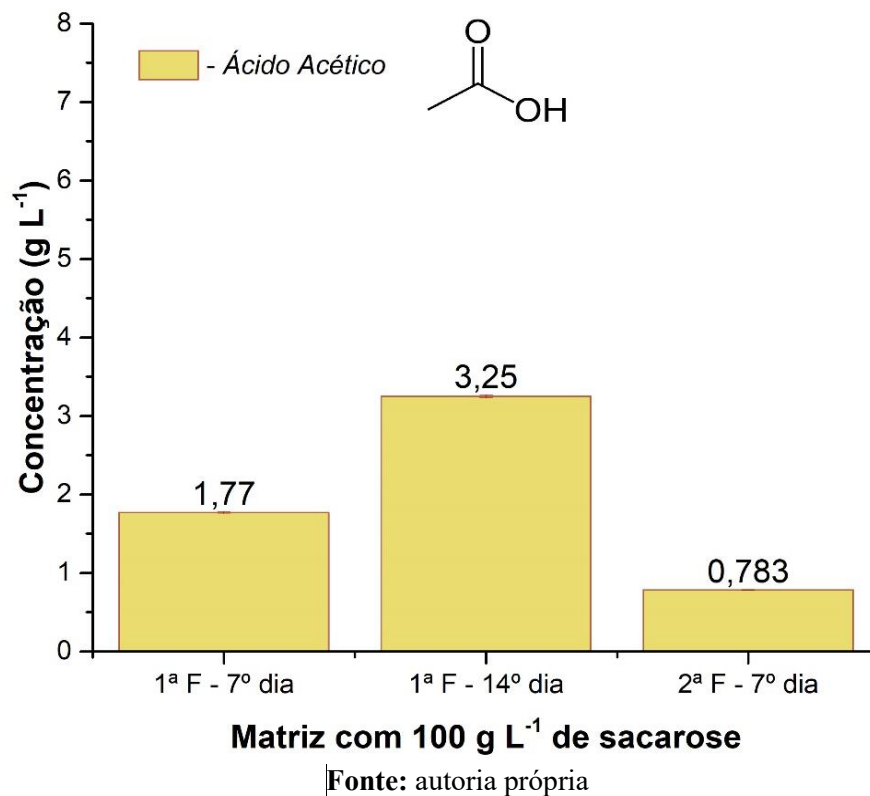


Figura 32 – Valores médios de ácido acético obtidos para MT200 com \pm DP de triplicatas.

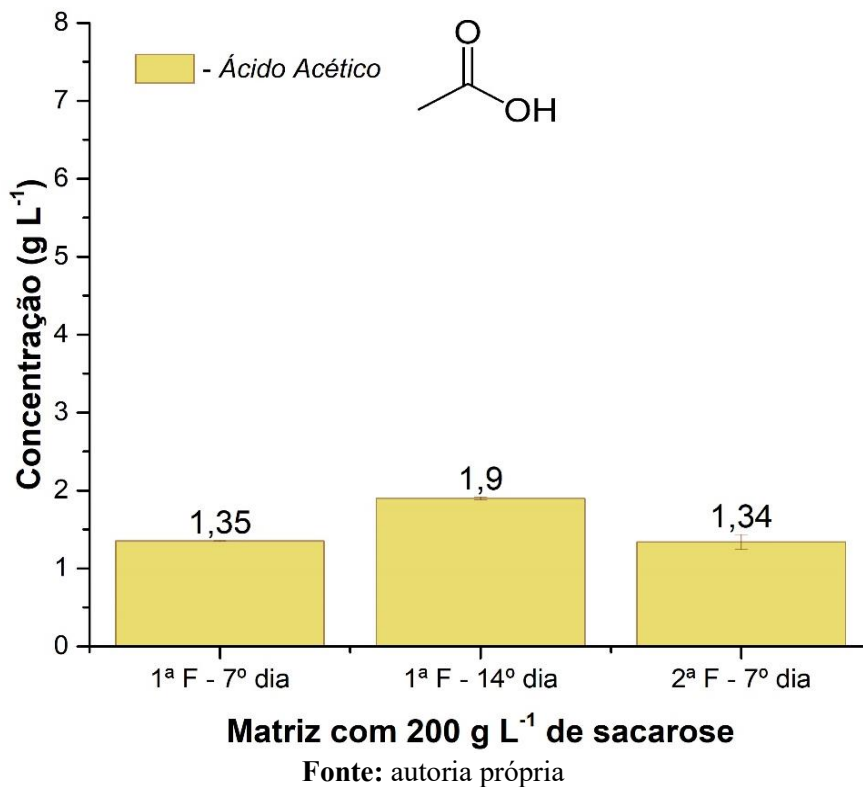


Figura 33 – Valores médios de ácido láctico obtidos para MT100 com \pm DP de triplicatas

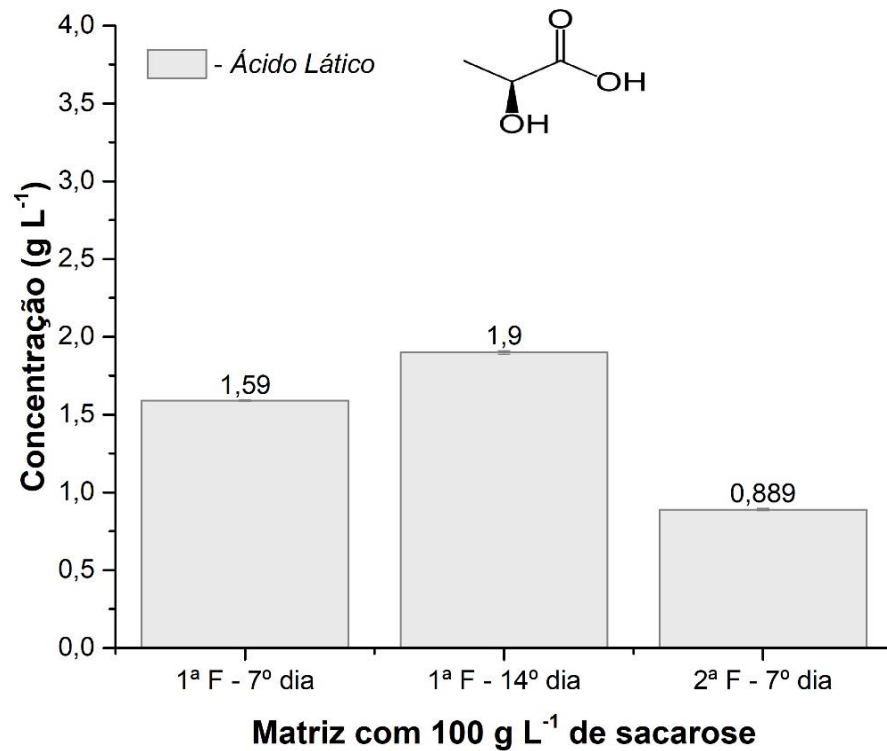


Figura 34 – Valores médios de ácido láctico obtidos para MT200 com \pm DP de triplicatas.

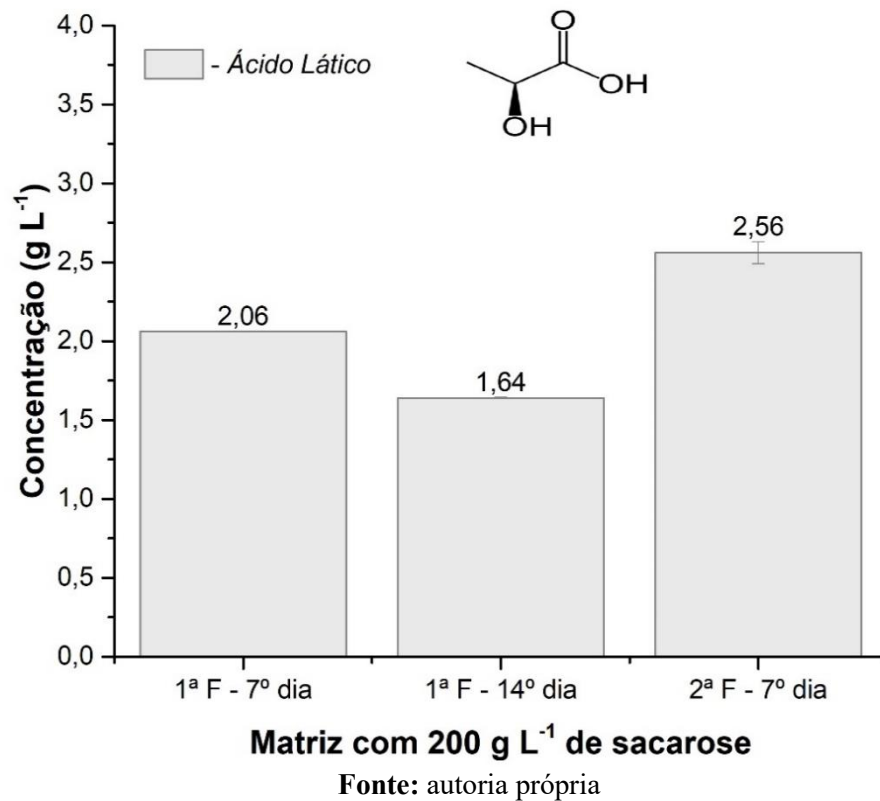
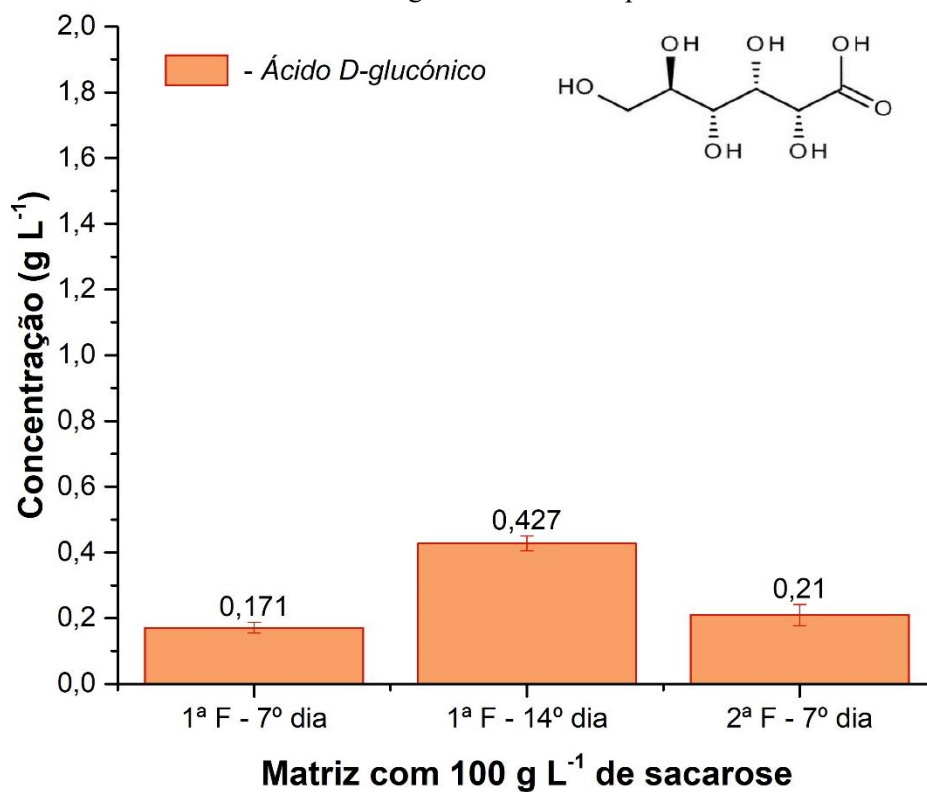
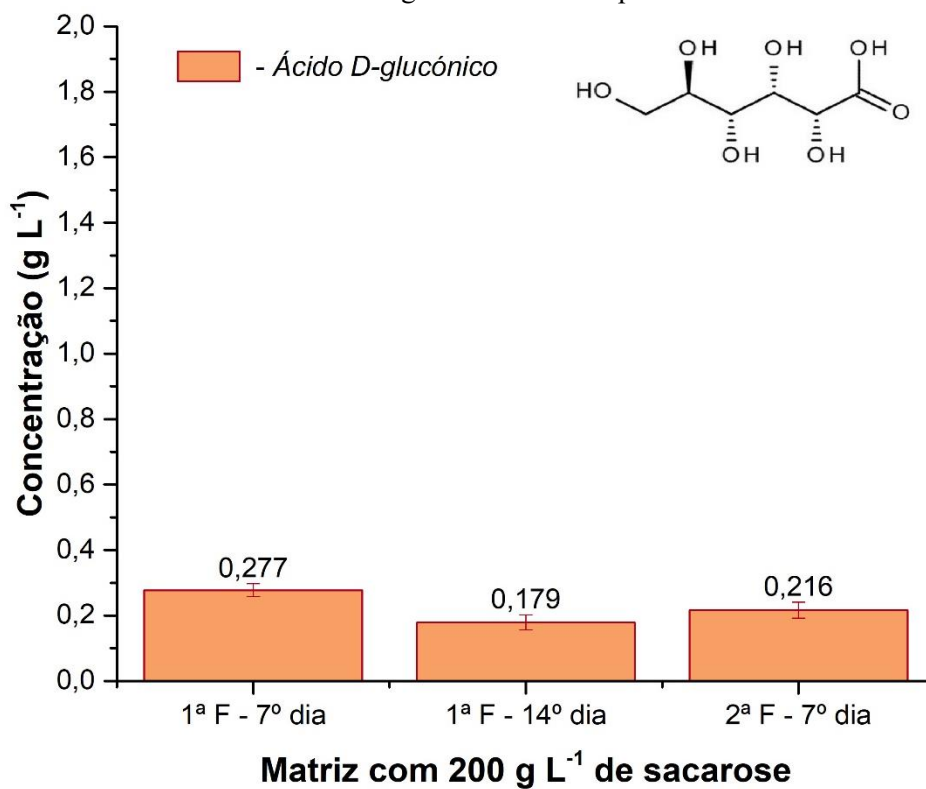


Figura 35 – Valores médios de ácido D-glucónico obtidos para MT200 com \pm DP de triplicatas.

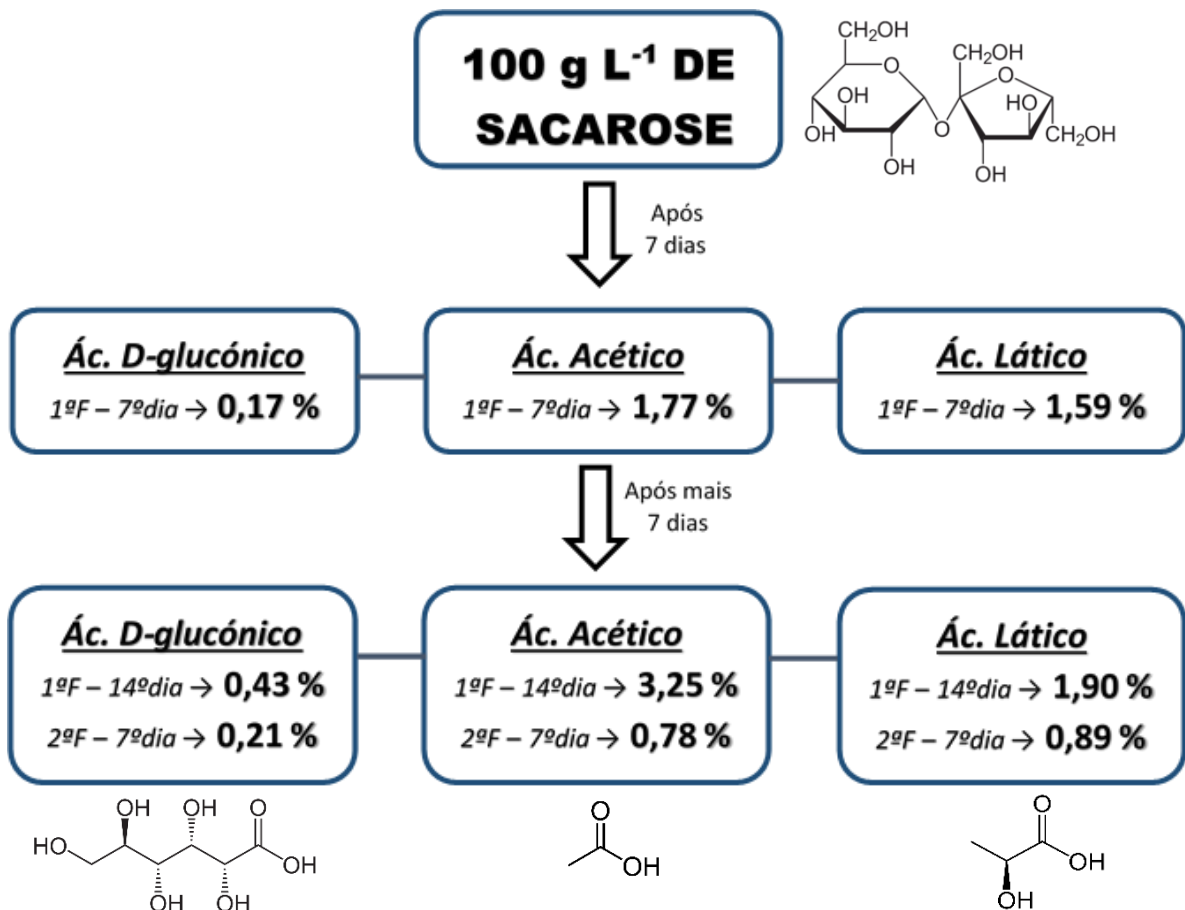
Fonte: autoria própria

Figura 36 – Valores médios de ácido D-glucónico obtidos para MT200 com \pm DP de triplicatas.

Fonte: autoria própria

As figuras 37 e 38 tratam-se de fluxogramas de MT100 e MT200 respectivamente, e mostram em valores percentuais a quantidade de cada ácido orgânico formado em relação a concentração inicial de sacarose de cada matriz fermentativa.

Figura 37 – Fluxograma dos valores percentuais de cada ácido em relação à concentração inicial de sacarose para MT100.

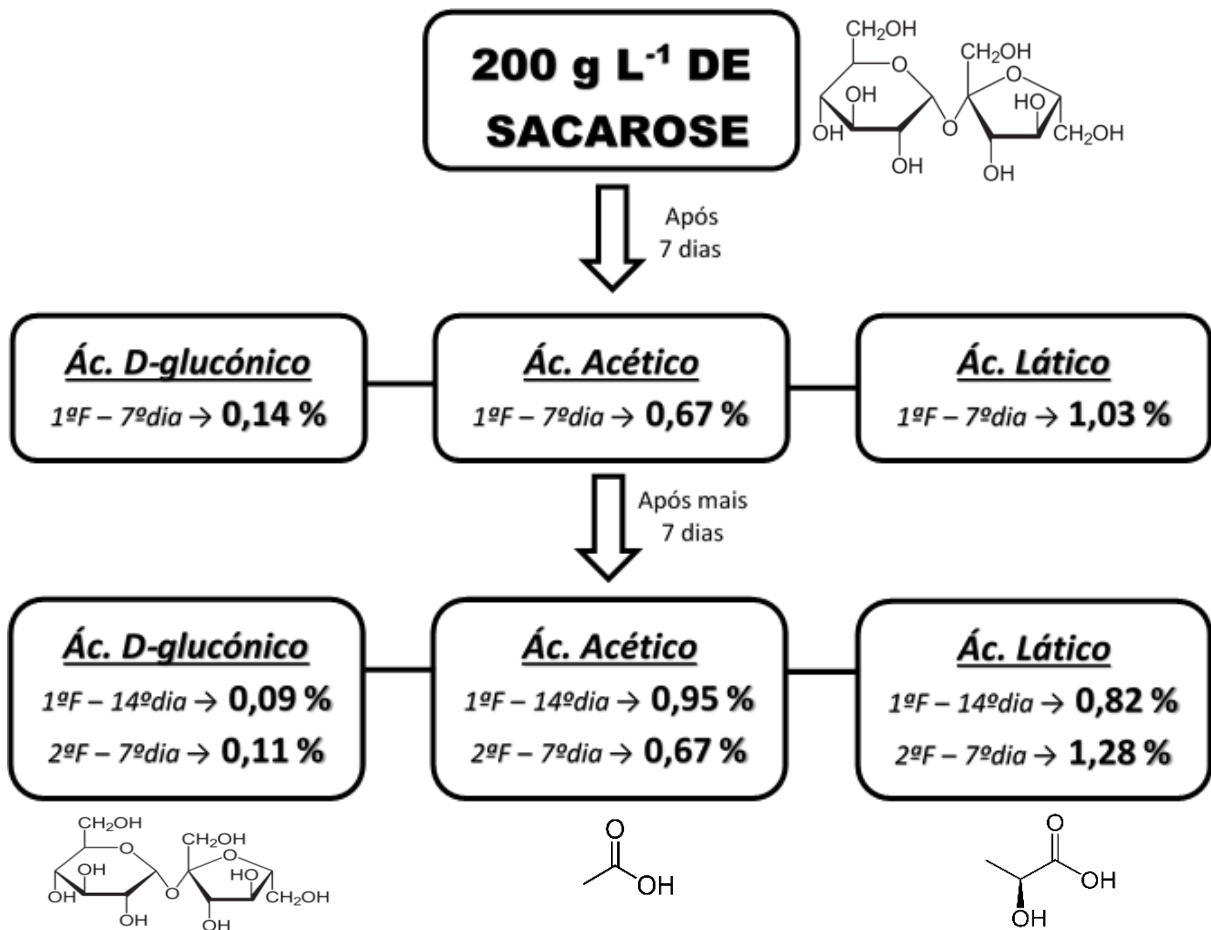


Desse modo, as figuras 36 e 37 servem e tem intuito de gerar um panorama geral de como se comportou a produção de cada ácido em uma perspectiva comparativa entre MT100 (figura 36) e MT200 (figura 37) tentando estabelecer uma correlação e entender se diferentes concentrações de açúcar influenciam muito ou pouco na produção desses ácidos orgânicos.

Em termos gerais, analisando as variações de cada componente em uma perspectiva de proporcionalidade, as figuras 36 e 37, não deixam evidente qualquer tipo de correlação muito forte associada diretamente a concentração de sacarose inicial do meio e a produção de todos os ácidos presentes na bebida em termos percentuais. Entretanto, vale destacar que MT100 com

menor concentração inicial de sacarose favoreceu muito mais a produção de ácido acético, tanto em valores brutos quanto em valores de variação percentual em relação a quantidade inicial de sacarose comparado à MT200, como será melhor discutido na seção 4.4.1.

Figura 38 – Fluxograma dos valores percentuais de cada ácido em relação à concentração inicial de sacarose para MT200.



Fonte: autoria própria

4.4.1. ÁCIDO ACÉTICO

Com pode ser observado nos valores apresentados nas figuras 31 e 32, fica nítido que MT100 produziu muito mais ácido acético (cerca de 41,5% a mais para o 14º dia) que MT200 tanto no 7º quanto 14º dia das 1ªs fermentações. Esse fato muito pode estar associado a concentração de oxigênio no meio fermentativo, que é um componente reacional determinante para realização da oxidação do etanol a acetaldeído pela enzima álcool-desidrogenase e posteriormente a oxidação do acetaldeído a ácido acético pela enzima acetaldeído-

desidrogenase. Dessa forma pode-se supor que sistemas fermentativos com maiores concentrações de sacarose possam diminuir a disponibilidade de oxigênio no meio, fazendo assim, com que os microrganismos presentes nas matrizes fermentativas com maiores concentrações de sacarose fiquem limitados para realização e geração dos produtos de oxidação.

Em relação a segunda fermentação pode-se observar uma diminuição da concentração de ácido acético do 7º dia (2ªF – 7ºdia) em relação ao dia 0 (que no caso é equivalente ao 1ªF – 7ºdia) de 55,8% para MT100. Esse fenômeno provavelmente possa estar associado a degradação do ácido acético pelas próprias bactérias do gênero *acetobacter*, que na ausência de substratos reacionais consomem o próprio ácido acético já produzido (RIZZON, 2006). Já para MT200 não se observou variações muito significativas durante o processo fermentativo em meio anaeróbico, se mantendo estável durante o processo de carbonatação.

4.4.2. ÁCIDO LÁTICO

Um ponto importante a se destacar sobre a fermentação láctica, é que essa é realizada pela via anaeróbica pelas bactérias ácido láctico que no geral são do gênero *lactobacilos*, onde através de algumas reações bioquímicas catalisadas por várias enzimas convertem glicose e frutose em piruvato, e esse por sua vez é convertido a lactato pela enzima piruvato-desidrogenase (KANDLER, 1983; LIU, 2003).

Os valores disposto na literatura em relação a quantidade de ácido láctico formado na bebida fermentada variam de 0 a 0,7 g L⁻¹ de acordo com Miranda D. et al. (2022), porém valores acima de 2 g L⁻¹ foram relatados por Augusto A. (2022), que realizou um estudo cinético utilizando como substrato extrato hidrossolúvel de amêndoas e castanha de caju, a matriz que apresentou esses valores foi inoculada com uma mistura de 50% kefir com 50% de kombucha previamente fermentada.

Assim, observando os altos valores de ácido láctico obtidos para matrizes de fermentação feitas com café verde 100% arábica do presente trabalho pode-se concluir que possivelmente houve uma alta população de bactérias do gênero *lactobacilos* presente nas mesmas. Analisando os valores apresentados nas figuras 33 e 34, pode-se destacar que MT200 apresentou maiores valores de ácido láctico para o 7º dia das 1ªs fermentações, e essa relação se inverteu no 14º e 7º dia das 1ªs e 2ªs fermentações respectivamente. A partir desse fato não foi possível chegar a

conclusões muito lógicas para se estabelecer algum tipo de relação acerca das diferenças entre as quantidades produzidas desse ácido e as distintas concentrações de açúcar para cada matriz.

4.4.3. ÁCIDO D-GLUCÓNICO

O ácido D-glucónico como mencionado anteriormente é o principal precursor do ácido glucurônico que por sua vez possui alta capacidade de desintoxicação hepática, pois moléculas lipossolúveis que não podem ser eliminadas na urina ou na bile reagem com o ácido glucurônico gerando compostos que possam ser excretados, fenômeno que se dá pelo processo de conjugação com o ácido glucurônico (WANG et al., 2014). O ácido D-glucónico é proveniente da reação de oxidação de moléculas de D-glicose promovida principalmente pelas bactérias do gênero *acetobacter* e *gloconoacetobacter*.

Os valores de concentração desse ácido na kombucha encontrados na literatura relatam até 39 g L⁻¹ (para 60 dias de processo fermentativo) (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Observando as figuras 34 e 35, pode-se notar que o ácido D-glucónico assim como o ácido acético atingiu seu pico com 0,427 g L⁻¹ no 14º dia da 1ª fermentação da MT100, valor 58,1 % maior que o apresentado pela MT200 no mesmo período, enquanto que MT200 teve uma queda de 35,4 % do 7º para o 14º dia da 1ª fermentação.

O motivo para isso muito provavelmente pode ser similar ao motivo do ácido acético ter tido um comportamento similar durante o mesmo período, pois sendo o oxigênio um fator determinante na formação desse ácido. Pode-se dizer que devido a possibilidade de sistemas fermentativos com maiores concentrações de sacarose possivelmente comprometerem a disponibilidade de oxigênio no meio, matrizes fermentativas com maiores concentrações de sacarose também desfavoreçam a produção desse ácido.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da kombucha ainda não ser uma bebida extremamente popular como outros produtos já consolidados no mercado, pesquisas apontam que a extensão no mercado desse seguimento está avaliada em 2,59 bilhões de dólares (POLARIS, 2022), que comparado a outros produtos no seguimento de bebidas, é um valor relativamente baixo. A extensão do mercado no seguimento de cervejas por exemplo, está avaliada atualmente em 793,74 bilhões de dólares (LARGER; ALE; STOUTS, 2023). Isso indica que a kombucha é uma bebida com grande potencial mercadológico de crescimento econômico, tendo em vista os novos hábitos de consumo e estilo de vida mais saudável que vem sendo adotado pela população (POLARIS, 2022).

Dentro desse contexto, o presente trabalho veio com a proposta de estudar e caracterizar de maneira composicional e cinética da união da kombucha (uma bebida probiótica, com diversos ácidos orgânicos e um bom caráter antioxidante) com o café verde (uma das commodities mais produzidas pelo Brasil no cenário mundial) em diferentes concentrações de sacarose.

Os principais resultados desse trabalho a serem destacados, revelaram que a bebida apresentou um bom potencial antioxidante com valores da ordem 800 mg L^{-1} EAG, sendo que essa ordem de grandeza se mostrou estável para as 2^{as} fermentações, as quais, não se tem tantos dados disponíveis na literatura. Também verificou-se que o teor alcoólico da bebida se mostrou diretamente proporcional a concentração de sacarose inicial presente, e que as condições anaeróbicas da etapa de carbonatação (2^a fermentação) tem um efeito potencializador no que tange ao aumento e ao maior acúmulo de etanol gerado no meio. E por último, mas não menos importante, em termos composicionais, maiores concentrações de sacarose no meio fermentativo não se mostraram diretamente proporcionais a produção dos ácidos orgânicos característicos da bebida.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Alguns pontos que ainda podem ser estudados para melhor compreender o processo fermentativo da kombucha de café verde 100% arábica e viabiliza-la comercialmente são:

- Fazer uma caracterização microbiológica da bebida tendo vista as altas concentrações de ácido lático obtidas.

- Testar novas concentrações de sacarose, inóculo e verificar se há mudanças para versões feitas com açúcar branco refinado.
- Por último, realizar uma análise sensorial da bebida e obter parâmetros como índice de aceitação para melhor compreender a sua viabilidade comercial.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, R. C. et al. Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 929–934, 2010.

ANTONIO AUGUSTO LIMA ARAUJO FILHO. **ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO DE KEFIR E KOMBUCHA EM EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE AMÊNDOA DE CASTANHA DE CAJU**. [s.l: s.n.].

ASSOCIADA, A. et al. Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixe de elétrons. 2007.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BIANCHI, M. P. ANTUNES, L. M. FREE RADICALS AND THE MAIN DIETARY ANTIOXIDANTS. **Rev. Nutr.**, v. 35, n. 1, p. 123–130, 1999.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanism in. **WAO Journal**, v. 22, n. 96, p. 9–19, 2012.

BORZANI, W. et al. **BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL - Volume 2**. [s.l: s.n.]. v. 2

BORZANI, W. et al. **BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL - Volume 3**. 2ª Reimpre ed. [s.l: s.n.].

BRASIL. **LEI Nº 11.705 DE 19 DE JUNHO DE 2008**. , 2008.

BUENO, F.; CHOULJENKO, A.; SATHIVEL, S. Development of coffee kombucha containing *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*: Gastrointestinal simulations and DNA microbial analysis. **Lwt**, v. 142, n. January, p. 110980, 2021.

CHERYL ROCK, RACHEL BLAINE, CHRISTINE COSTA, L. M. L. Consumer Acceptability of a Kombucha Coffee (Coffea) Prototype with Traditional Coffee Characteristics. **ProQuest Dissertations and Theses**, n. August, p. 81, 2017.

COELHO, R. M. D. et al. Kombucha: Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 22, n. July, p. 100272, 2020.

COSTA, J. S. D. DA et al. Consumo abusivo de álcool e fatores associados: estudo de base populacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 284–291, 2004.

DALA, BRUNO MARTINS; GOZZI, WILLIAM PERMAGNANI; KRINGEL, DIANINI; PELOSO, EDUARDO DE FIGUEIREDO; CUSTODIO, F. B. **Bruno Martins Dala Paula 1ª Edição Alfenas-MG**. [s.l: s.n.].

DE MIRANDA, J. F. et al. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 2, p. 503–527, 2022.

DIAS, T. Determinação do teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) - Espectrofotometria. p. 01–06, 2016.

FERREIRA, M. D.; SPRICIGO, P. C. Colorimetria - princípios e aplicações na agricultura. **Embrapa**, p. 209–220, 2017.

FLORENTINO, H. DE O.; BISCARO, A. DE F. V.; PASSOS, J. R. DE S. FUNÇÕES SIGMOIDAIS APLICADAS NA DETERMINAÇÃO DA 2 Materiais e métodos O teste da AME. p. 141–150, 2010.

IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. In: [s.l: s.n.]. p. 389–441.

JAYABALAN, R. et al. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227–234, 2008.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V; SATHISHKUMAR, M. B. T.-R. M. IN F. S. Kombucha. In: [s.l.] Elsevier, 2016.

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 392–398, 2007.

JOHN C. GILBERT, S. F. M. Experimental Organic Chemistry - A Miniscale and a Microscale Approach. In: **Fifth Edition**. [s.l: s.n.]. p. 55–56.

JONES, A. W.; COWAN, J. M. Reflections on variability in the blood–breath ratio of ethanol and its importance when evidential breath-alcohol instruments are used in law enforcement. **Forensic Sciences Research**, v. 5, n. 4, p. 300–308, 2020.

JORGE, M. Mafalda Jorge dos Santos KOMBUCHA: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS ALIMENTARES PARA USO EM RESTAURAÇÃO. 2016.

KAEWKOD, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of kombucha obtained from green, oolong and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 1–18, 2019.

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 226–232, 2012.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 49, n. 3, p. 209–224, 1983.

KULCU, R. Determination of the Effects of Different Packaging Methods and Materials on Storage Time of Dried Apple. **MATTER: International Journal of Science and Technology**,

v. 4, n. 2, p. 238–255, 2018.

LARGER; ALE; STOUTS. Beer Market Size. **Market Research Report**, p. 150, 2023.

LEAL, J. M. et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 2018.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 115–131, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.; MAPA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 17 DE SETEMBRO DE 2019.** , 2019.

OLIVEIRA, B. **Alimentação saudável e praticidade: tendência cresce em todo o mundo.** Disponível em: <<https://digitalagro.com.br/2022/10/05/busca-por-alimentacao-saudavel-e-pratica-cresce-em-todo-o-mundo/>>. Acesso em: 1 jun. 2023.

OLIVEIRA, D. T. **Parâmetros de qualidade do açúcar e amarelecimento no armazenamento. SIMPÓSIO CEAGESP. D'Oliveira Consultoria Sucroalcooleira**, 2014. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/wp-content/uploads/2015/01/palestra.danilo.tostes.pdf>>

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 1, p. 36–60, 2013.

PILLING, S. Refratometria. Determinação do índice de refração de líquidos. **UniVap**, p. 1–8, [s.d.].

POLARIS. **Kombucha Market Share, Trends, Size, Industry Analysis Report, By Product (Organic, Inorganic), By Type (Natural, Flavored), By Microbial, By Distribution Channel, By Region; Segment Forecast, 2022 - 2030.** Disponível em:

<<https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/kombucha-market#:~:text=The global kombucha market is,15.7%25 during the forecast period.>>.

PRACTICES, O. OENO 56/2000 - **VINAIGRES DE VIN - DETERMINATION DE LA TENEUR EN ALCOOL RESIDUEL**. l'OIV - Organisation Internationale de la vigne et du Vin, v. d, n. 1645, p. 1–76, 2000.

RIZZON, L. A. **Sistema de Produção de Vinagre - Fermentação acética**. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/fermentacao.htm>>.

S/A., U. S. I. **ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DO PRODUTO - AÇÚCAR DEMERARA**. , 2023. Disponível em: <<https://www.usinasantaisabel.com.br/wp-content/uploads/2023/04/ETP-007-R10-Acucar-Demerara.pdf>>

SZENTHE, A. **Top Coffee Producing Countries**. Disponível em: <<https://www.worldatlas.com/articles/top-coffee-producing-countries.html>>.

TALEBI, M. et al. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 12, p. 4062–4067, 2017.

TRANSPORTES, M. DOS. **Contran**. Disponível em: <<https://www.gov.br/transportes/pt-br/assuntos/transito/contran>>.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580–588, 2018.

WANG, Y. et al. Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 265–272, 2014.

WATAWANA, M. I. et al. Evaluation of the Effect of Different Sweetening Agents on the

Polyphenol Contents and Antioxidant and Starch Hydrolase Inhibitory Properties of Kombucha. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. e12752, 2017.

ZEGLER, J. **Convenience and Health to be Top Priorities for US Consumers**. Disponível em: <<https://www.preparedfoods.com/articles/126385-convenience-and-health-to-be-top-priorities-for-us-consumers>>.

ZHU, Q. Y. et al. Stability of Green Tea Catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4624–4628, 1997.